

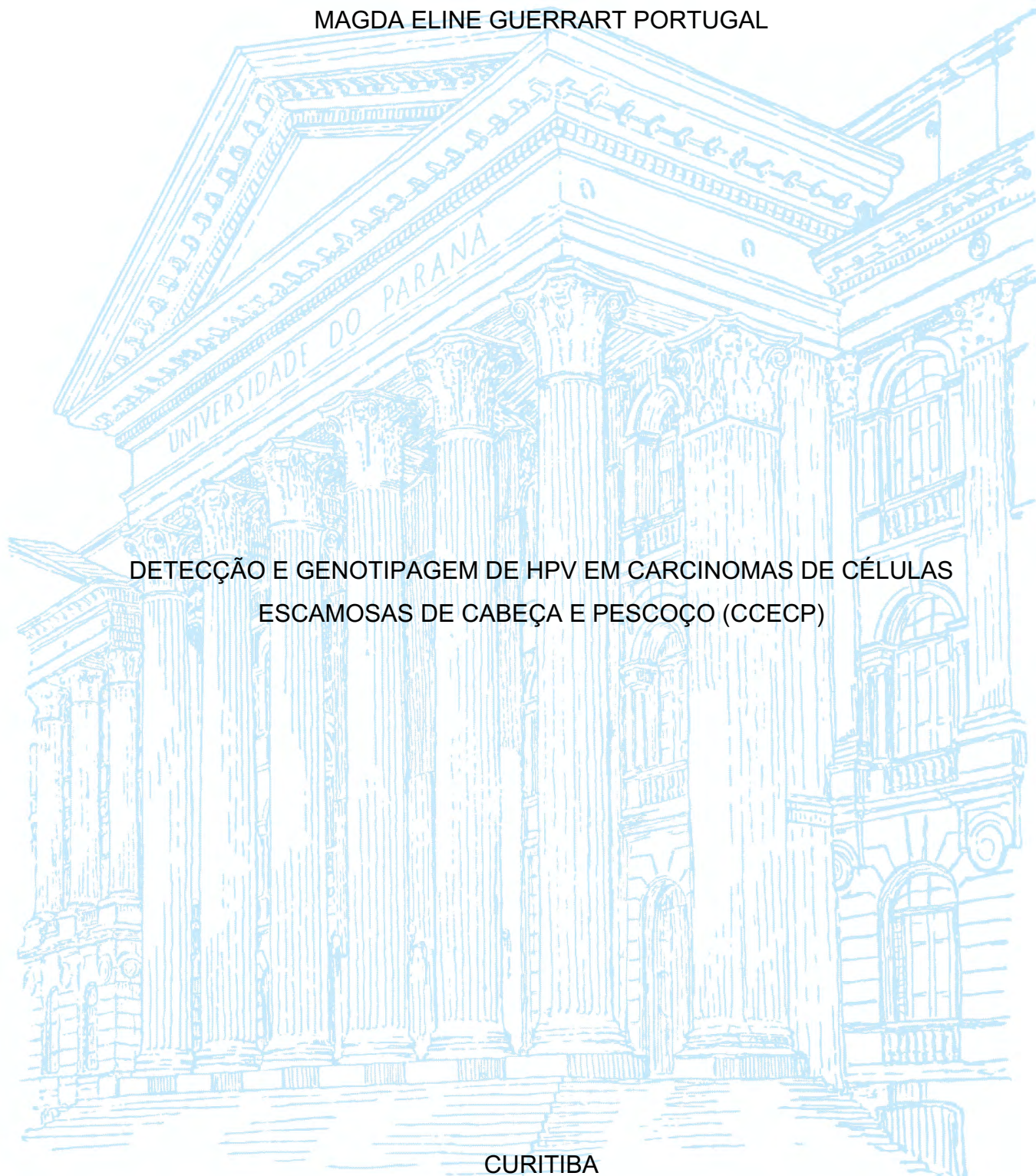
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV EM CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO (CCECP)

CURITIBA

2019



MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV EM CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO (CCECP)

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2019

P853 Potugal, Magda Eline Guerrart

Detecção e genotipagem de HPV em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) [recurso eletrônico] / Magda Eline Guerrart Portugal. – Curitiba, 2019.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia Mara Raboni

1. Papillomaviridae. 2. Neoplasias de cabeça e pescoço.
3. Genótipo. I. Raboni, Sonia Mara. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: QW 165.5 P2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL** intitulada: *Detecção e Genotipagem de HPV em Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (CCECP)*, sob orientação da Profa. Dra. SONIA MARA RABONI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Dezembro de 2019.

SONIA MARA RABONI
Presidente da Banca Examinadora

MERI BORDIGNON NOGUEIRA
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MÉDICA)

SERGIO HERRERO MORAES
Avaliador Externo (FAC. HERRERO)

CASSIUS CARVALHO TORRES PEREIRA
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA)

MARILENE DA CRUZ MAGALHÃES BUFFON
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DA SAÚDE COLETIVA)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fôlego de vida, sustento e proteção em toda a jornada.

Ao meu amado esposo, Helio Sérgio Portugal, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Aos meus queridos pais, Denise Guerrart e José Basílio Guerrart pelo exemplo de vida e estímulo aos estudos.

À Prof^a. Dr^a. Sonia Mara Raboni, pela orientação, apoio, incentivo, confiança e amizade.

A todos os envolvidos com o Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, pelo acolhimento e confiança.

Aos amigos e colegas de laboratório e da pós-graduação pela amizade, companheirismo e pela colaboração na realização desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Meri Bordignon Nogueira e equipe do Laboratório de Virologia pelo suporte constante e amizade.

Aos profissionais e funcionários do Banco de Sangue (BIOBANCO) do Complexo Hospital de Clínicas – CHC/UFPR pelo estímulo e apoio.

A todos os profissionais, funcionários e pacientes do CHC/UFPR e do Hospital Erasto Gaertner (HEG) que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Lawrance Banks e à Prof^a. Dr^a. Justyna Broniarczyk pelos conhecimentos, oportunidades e principalmente, pela amizade e incentivo.

Ao *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* – ICGEB pelo auxílio financeiro.

À direção e demais colaboradores da Faculdade Herrero, pelo incentivo e apoio.

À CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) são o sexto tipo de tumor mais comum mundialmente. Embora o consumo de tabaco e álcool estejam associados com a maioria desses tumores, o aumento na incidência de casos em regiões anatômicas específicas sugere que a infecção por certos tipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco, possa ser responsável por um distinto grupo de neoplasias de cabeça e pescoço. Este estudo refere-se à investigação da prevalência e do perfil da infecção por HPV em casos de CCECP, de pacientes atendidos em um hospital terciário na região Sul do Brasil. Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva, analítico, observacional. Foram avaliadas 130 amostras de material incluído em parafina, que foram submetidas ao isolamento do DNA e à detecção do material genético do HPV por meio de PCR *touchdown*. A genotipagem do HPV foi realizada por meio de sequenciamento nucleotídico. Os resultados mostraram que a mediana de idade da população estudada foi de 60 anos (15,75), com 76,2% (n=99) de casos diagnosticados a partir da quinta década de vida. A maior parte dos casos foi de homens (86,9%, n=113) e 79,2% (n=103) dos casos estudados apresentaram cor da pele branca. O HPV foi identificado em 24,6% (n=32) das amostras analisadas, sendo os tipos mais prevalentes o HPV-6 (75%, n=24), 11 (44%, n=14), 53 (9,4% n=3), 35 (9,4% n=3). A baixa escolaridade apresentou-se como um fator de proteção à infecção por HPV (p=0,007; OR: 0,036 a 0,523). Os tumores de lábio e cavidade bucal representaram 59,4% (n=19) dos casos HPV positivos, os de orofaringe 9,4% (n=3) e os de laringe 25% (n=8), sendo que na cavidade bucal, 52,6% (n=10) dos casos HPV positivos eram de tumores de língua e assoalho bucal. Dos casos HPV positivos, 87,5% (n=28) receberam tratamento combinado e 62,5% (n=20) foram a óbito. Foram identificados 30 tipos de HPV dos gêneros *alpha*, *beta* e *gamma*, sendo a maioria das infecções por HPV do gênero *alpha* (93,8%, n=30). Lábio e cavidade bucal foram os únicos sítios com infecções por HPV do gênero *gamma*. Não foram encontradas infecções por HPV do gênero *beta* nos casos de óbito. Para as mono-infecções (25%, n=8), o sítio mais prevalente foi a laringe (9,4%, n=3), e para as infecções múltiplas (75%, n=24), lábio e cavidade bucal (53,1%, n=17). Não ter cor da pele branca mostrou-se ser um fator de proteção contra infecções múltiplas (p=0,006; OR: 0,023 a 0,48; IC 95%). A frequência de infecção pelo HPV encontrada neste estudo mostrou-se acima do encontrado em estudos com outras populações brasileiras, mas de acordo com a média encontrada em relatos de meta-análise. A baixa escolaridade apresentou-se como um fator de proteção à infecção por HPV, e não ter cor da pele branca mostrou-se ser um fator de proteção contra infecções múltiplas por HPV. Mais estudos são necessários para conhecer a história natural da infecção por HPV e sua associação com o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. Câncer de cabeça e pescoço. Genótipos. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are among the world's most common cancers. Although tobacco and alcohol consumption are associated with the majority of these tumors, increasing trends in the incidence at specific sites suggest that infection by certain high-risk types of human papilloma viruses (HPV) is responsible for a distinct set of head and neck tumors. This work investigated the prevalence and clinic profile of HPV infection in HNSCC at a tertiary hospital in Southern Brazil. It is a cohort retrospective observational and analytical study. DNA isolation of 130 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples was performed, and HPV detection was assessed through touchdown PCR. HPV DNA genotyping was performed through sequencing. The results showed that the median age of patients was 60y (15.75), with 76.2% (99/130) of the cases diagnosed after the fifth decade of life. Most of the cases were in males (86.9%, 113/130) and 79.2% (103/130) of the cases were among whites. HPV DNA was identified in 24.6% (32/130) of the samples, with the most prevalent HPV types being HPV-6 (75%, 24/32), 11 (44%, 14/32), 53 (9.4%, 3/32) and 35 (9.4%, 3/32). Having a low educational level was a protective factor against HPV infection ($p=0.007$; OR: 0.036-0.523). Lip and buccal cavity tumors represented 59.4% (19/32) of the HPV positive cases, oropharynx tumors were 9.4% (3/32) and larynx tumors were 25% (8/32). Among lip and buccal cavity tumors, 31.6% (6/19) were in the tongue region. Among the HPV positive cases, 87.5% (28/32) received combined treatment and 62.5% (20/32) died. Thirty HPV types from alpha, beta and gamma genera were identified and most of the infections were with HPV from the alpha genus (93.8%, 30/32). Lip and buccal cavity were the only sites with HPV of the gamma genus. Also, the gamma genus was only detected in tumors staged as T3 and T4, and in well or moderately differentiated cases. No HPV infection from the beta genus was detected among those patients who died. Among single HPV infections (25%, 8/32), larynx was the most prevalent site (9.4%, 3/8), and among multiple HPV infections (75%, 24/32), lip and buccal cavity (53.1%, 17/32) were the most prevalent ones. Not being white was a protective factor against multiple HPV infections ($p=0.006$, OR: 0.023-0.48, IC 95%). The frequency of HPV infection found in this work was higher than the ones found among other Brazilian populations but is in accordance with the media value found in meta-analysis studies. Low educational levels were a protective factor against HPV infection and not being white was a protective factor against multiple HPV infections. Additional prospective studies are needed to know the natural history of mixed HPV infection and its association with the development of head and neck neoplasia.

Keywords: Human papillomavirus. Head and neck cancer. Genotypes. Polymerase chain reaction.

LISTA DE ABREVIATURAS

β	- Beta
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCE	- Carcinomas de Células Escamosas
CCECP	- Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CID	- Classificação Internacional de Doenças
CX	- Cirurgia
DNA	- Ácido Dextrorribonucleico
dNTP	- Desoxirribonucleosídeo Trifosfato
FFPE	- <i>Formalin-fixed Paraffin-embedded</i>
HCH	- Complexo Hospital de Clínicas
HEG	- Hospital Erasto Gaertner
HNSCC	- <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinomas</i>
HPV	- Papilomavírus Humano
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IIQ	- Intervalo Interquartil
INCA	- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
LCR	- Região Longa de Controle
OMS	- Organização Mundial da Saúde
pb	- Pares de Base
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
QT	- Quimioterapia
RT	- Radioterapia
SI	- Sem Informação
THC	- <i>Tetrahydrocannabinol</i>
Tis	- Carcinoma <i>in situ</i>
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VLP	- <i>Virus-like Particles</i>
WHO	- World Health Organization
μ l	- Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1	CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO.....	13
2.1.1	Conceito e Classificação.....	13
2.1.2	Epidemiologia.....	15
2.1.3	Fatores de Risco.....	19
2.2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	21
2.1.2	História Natural da Doença e Ciclo de Vida do Papilomavirus Humano (HPV).....	21
2.1.2	Oncogênese do HPV.....	27
2.1.3	Perfil dos CCECP HPV positivos.....	29
2.3	TRATAMENTO DOS CCECP.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	MATERIAL.....	35
4.1.1	Amostras Utilizadas no Estudo.....	35
4.1.2	Crítérios de Inclusão e Exclusão.....	35
4.2	MÉTODOS.....	36
4.2.1	Dados Clínicos e Demográficos.....	36
4.2.2	Tipo de Estudo.....	36
4.2.3	Aspectos Éticos.....	36
4.2.4	Métodos Moleculares.....	37
4.2.4.1	Extração de DNA.....	37
4.2.4.1.1	Extração de DNA de amostras de biópsia de tecido fresco.....	37
4.2.4.1.2	Extração de DNA de tecido incluído em parafina utilizando xilol.....	38
4.2.4.2	Amplificação do controle interno.....	38
4.2.4.2.1	PCR para o gene da β -globina humana.....	38
4.2.4.3	Detecção molecular do HPV.....	39

4.2.4.3.1	Técnica de semi- <i>nested</i> PCR.....	40
4.2.4.3.1.1	PCR para o gene <i>L1</i>	41
4.2.4.3.2	Técnica de <i>nested</i> PCR.....	43
4.2.4.3.2.1	PCR para o gene <i>L1</i>	43
4.2.4.3.3	Técnica de PCR <i>touchdown</i>	44
4.2.4.4	Purificação do produto de PCR.....	46
4.2.4.5	Reação de Sequenciamento Nucleotídico e Análise Filogenética..	46
4.3	OBTENÇÃO DE CLONES DE HPV-11 PARA CONTROLE POSITIVO DAS AMOSTRAS TESTADAS.....	47
4.3.1	Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	47
4.3.2	Clonagem do Gene <i>L1</i> do HPV-11 em Vetor de Alto Número de Cópias.....	47
4.3.2.1	Reação de ligação.....	47
4.3.2.2	Transformação de bactérias competentes.....	47
4.3.2.3	Seleção de clones recombinantes.....	48
4.3.2.4	Mini-preparações plasmidiais.....	48
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS	49
5.1	PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO.....	49
5.2	MÉTODOS MOLECULARES.....	51
5.2.1	Extração de DNA de Amostras de Biópsia de Tecido Fresco e Padronização da Técnica Extração de DNA de Tecido Incluído em Parafina Utilizando Xilol.....	51
5.2.2	Padronização da Amplificação do Material Genético do HPV.....	52
5.2.3	Clonagem do Gene <i>L1</i> do HPV-11.....	53
5.2.4	Padronização da Reação de Sequenciamento Nucleotídico e Análise da Sequência Consenso.....	54
5.3	PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS COM INFECÇÃO POR HPV.....	57
5.3.1	Prevalência da Infecção por HPV.....	57
5.3.2	Perfil da Distribuição da Infecção por HPV.....	60
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	79

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXO 1 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	96
	ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – CEP/HC/UFPR, Nº 1.101.574.....	98
	ANEXO 3 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – CEP/HC/UFPR, Nº 1.342.916.....	102
	ANEXO 4 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER / LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER – CEP/HEG, Nº 1.508.287.....	106
	ANEXO 5 – PUBLICAÇÃO.....	113

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimava-se que o número anual de casos novos de câncer no mundo em 2020 ultrapassasse os 15 milhões, com a maior parte dos casos novos (aproximadamente 60%), ocorrendo em regiões menos desenvolvidas (WHO, 2002). Todavia, os casos de tumores ultrapassaram os 18 milhões em 2018, tendo sido responsáveis por 9,6 milhões de mortes mundialmente (BRAY et al., 2018).

Embora a incidência dos tumores de cavidade bucal, orofaringe e laringe tenha diminuído nas últimas duas décadas, os índices mundiais de tumores de orofaringe aumentaram em média 2,9% ao ano entre 2001 e 2010, com as estimativas totalizando mais de 92.000 casos novos e aproximadamente 51.000 mortes em 2018 (HOWLADER et al., 2013; BRAY et al., 2018).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2018-2019, era de 11.200 casos novos de câncer da cavidade bucal e orofaringe em homens e 3.500 em mulheres (INCA, 2018). Para o câncer de laringe, as estimativas brasileiras eram de 6.390 casos novos em homens e 1.280 em mulheres (INCA, 2018).

Mais de 90% dos tumores de cavidade bucal, orofaringe, faringe e laringe têm sua origem nas células do epitélio escamoso, sendo por isso denominados de Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (CCECP). As neoplasias de orofaringe estiveram entre as mais comuns por muito tempo, representando aproximadamente 10% dos casos de CCECP, tendo seu desenvolvimento associado ao papilomavírus humano (HPV) em 72% dos casos (SMITH et al., 1998; GILLISON et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; FURNIS et al., 2009; GILLISON et al., 2013; WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2018). Atualmente, porém, outros sítios anatômicos em cabeça e pescoço como cavidade bucal e laringe, têm apresentado um aumento no número de casos de neoplasias, representando potenciais regiões para infecção pelo HPV (GILLISON et al., 2013; BRAY et al., 2018).

O aumento nos índices de tumores de células escamosas pode ser um reflexo de mudanças no comportamento que aumentem a exposição ao HPV (CHATUVERDI et al., 2008). Além disso, os CCECP relacionados ao HPV apresentam fatores de risco distintos daqueles não relacionados ao HPV, sendo biológica e clinicamente distintos dos CCECP causados por tabaco e álcool, tanto na

resposta à radio e quimioterapia quanto no desfecho clínico (APPLEBAUM et al., 2007; GILLISON et al., 2008; GILLISON et al., 2013).

Assim, a detecção da frequência e identificação dos genótipos de HPV nas lesões pré-malignas e tumores de cabeça e pescoço, associadas ao estudo das características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com neoplasias relacionadas ao HPV e sua correlação com as não relacionadas ao HPV, poderão nortear o desenvolvimento de estratégias de prevenção e detecção precoce do vírus, bem como de protocolos de intervenção clínica, o que poderia diminuir a incidência da infecção, os custos do tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente.

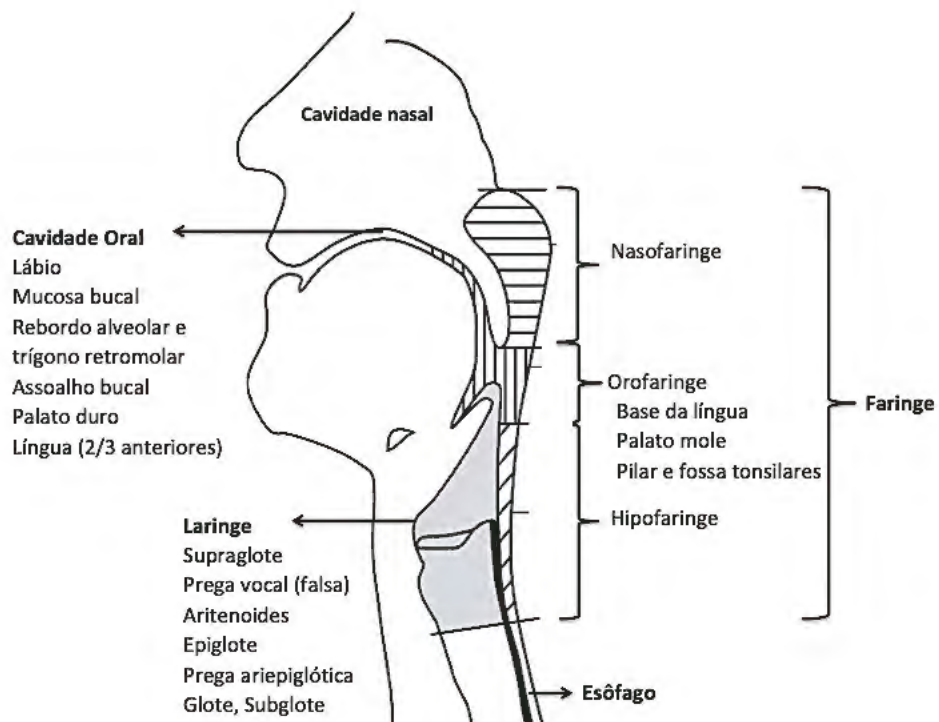
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO

2.1.1 Conceito e Classificação

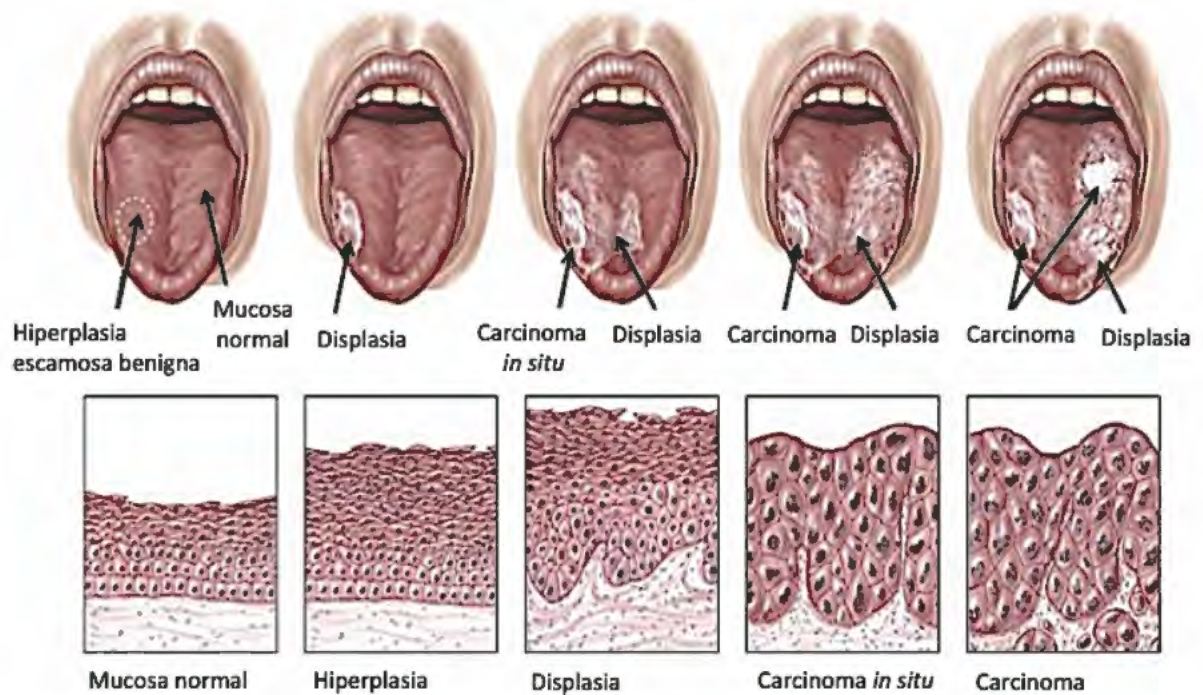
Os tumores de cabeça e pescoço compreendem uma grande categoria de diversos tipos tumorais que podem se originar de diversas estruturas anatômicas como ossos craniofaciais, tecidos moles, glândulas salivares, pele e membranas mucosas. A maior parte destes tumores, todavia, têm sua origem nas células do epitélio escamoso da cavidade bucal, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe, sendo portanto, denominados de Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (CCECP), conforme ilustrado nas FIGURAS 1 e 2 (PAI; WESTRA, 2009; ESMO, 2017).

FIGURA 1 - SÍTIOS E SUB-SÍTIOS ANATÔMICOS DA CABEÇA E PESCOÇO



FONTE: Adaptado de ESMO (2017).

FIGURA 2 - TRANSFORMAÇÃO DA MUCOSA NORMAL EM CARCINOMA INVASIVO



FONTE: Adaptado de PAI; WESTRA (2009).

Não há, até o momento, uma normatização científica sobre quais estruturas anatômicas compõem a definição de “tumores de cavidade oral”. Nas estimativas do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) foram consideradas como neoplasias malignas de lábio e cavidade oral aquelas que tenham como localização primária os lábios, a cavidade bucal, as glândulas salivares e a orofaringe, códigos C00 a C10, segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID 10). Na classificação de neoplasias de cabeça e pescoço, os tumores de laringe são classificados como C32 (INCA, 2016; INCA, 2018).

A maior parte dos estudos internacionais, todavia, segue a classificação apresentada pela *Cancer Today*, que agrega as recomendações da Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) e da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) (FERLAY et al., 2018). Tal classificação apresenta como tumores de cavidade bucal aqueles descritos como CID-10 C00 a C06, tumores de glândulas salivares os de CID-10 C07 e C08, tumores de orofaringe os de CID-10 C09 e C10, e tumores de laringe, os de CID-10 C32.

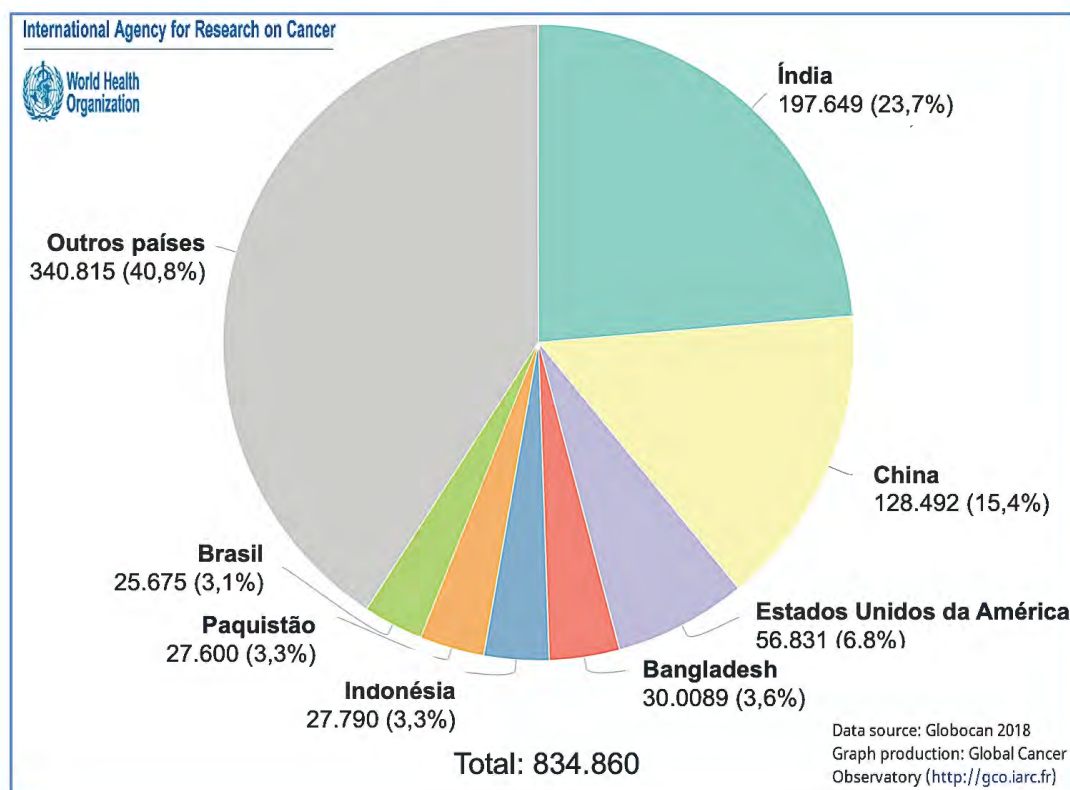
Considerando ainda as divergências nas tendências epidemiológicas entre os CCECP de diferentes sítios anatômicos, bem como o reconhecimento da existência de perfis genéticos e moleculares distintos, apesar da origem epitelial comum, tais tumores podem ser classificados em subtipos com fatores de risco, patogênese e desenvolvimento clínico distintos (ZUR HAUSEN, 2009; GILLISON et al., 2013; SCUDELLARI et al., 2013; WOODS et al., 2014; MOORE; MEHTA, 2015; NDIAYE et al., 2016; ESMO, 2017).

2.1.2 Epidemiologia

Os tumores de cabeça e pescoço são o sexto tipo mais comum de neoplasia, com uma incidência anual estimada entre 650.000 e 834.000 casos e 330.000 mortes no mundo, conforme demonstrado na FIGURA 3 (BRAY et al., 2012; ESMO, 2017; BRAY et al., 2018). Nos Estados Unidos da América (EUA), dos 53.000 americanos que desenvolvem tais tumores, 10.800 morrem em função da doença que é responsável por 3% das neoplasias no país (SIEGEL et al., 2019). No continente europeu, a incidência estimada para os referidos tumores foi de 4%, com aproximadamente 250.000 casos e 63.500 mortes em 2012 (GATTA et al., 2015).

FIGURA 3 - ESTIMATIVA DE NOVOS CASOS DE TUMORES DE LÁBIO, CAVIDADE ORAL

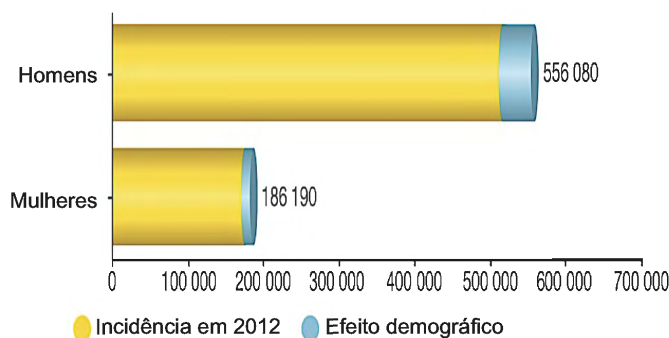
(CAVIDADE BUCAL E OROFARINGE), HIPOFARINGE, LARINGE E NASOFARINGE PARA TODAS AS IDADES EM AMBOS OS SEXOS, EM 2018



FONTE: Adaptado de BRAY et al., 2018.

A proporção de homens com a doença é significativamente maior do que a de mulheres, conforme apresentado na FIGURA 4, com índices que podem variar de 2:1 a 5:1 (BRAY et al., 2012; ESMO, 2017). A incidência em homens ultrapassa 20 por 100.000 em regiões como França, Hong Kong, subcontinente indiano, Europa central e ocidental, Espanha, Itália, Brasil e afro-americanos nos EUA. Os tumores de cavidade bucal e língua são os mais comuns no subcontinente indiano, sendo os tumores de nasofaringe mais comuns na região de Hong Kong. Nas demais populações, os tumores de faringe e ou laringe são os mais comuns (BRAY et al., 2012). No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cavidade oral (cavidade bucal e orofaringe) é o quinto de maior incidência em homens (5,2%), sendo que na região Sul, é o sexto mais frequente em homens e o décimo quinto em mulheres (INCA, 2018).

FIGURA 4 - INCIDÊNCIA MUNDIAL DE TUMORES DE LÁBIO, CAVIDADE ORAL (CAVIDADE BUCAL E OROFARINGE), LARINGE, NASOFARINGE E FARINJE, PARA TODAS AS IDADES E HOMENS E MULHERES, EM 2012

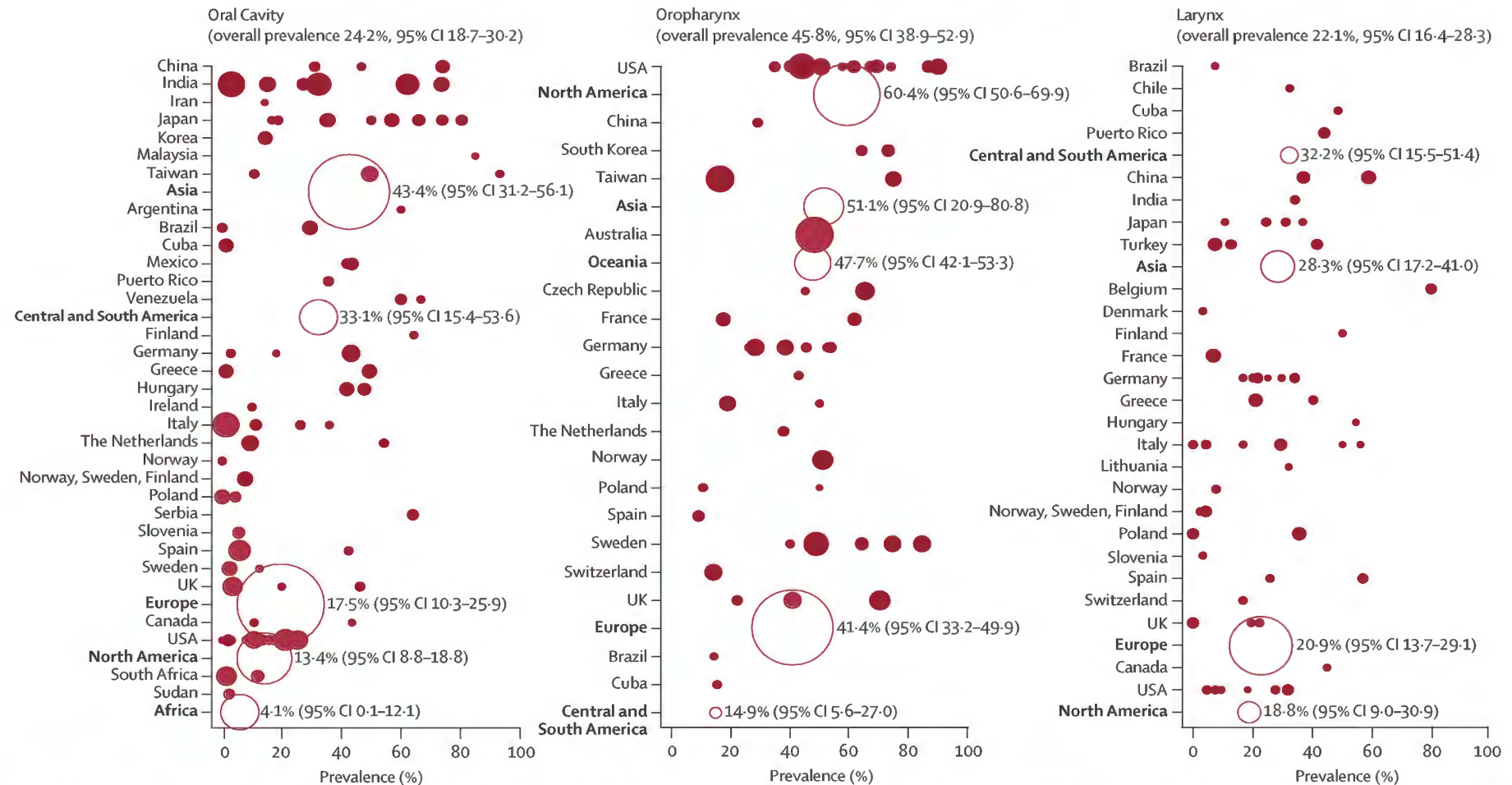


FONTE: Adaptado de ESMO (2017).

Entre os CCECP, as neoplasias de orofaringe representam aproximadamente 10% dos casos, sendo que aproximadamente 72% dos mesmos estão relacionadas com o HPV (GILLISON et al., 2013; WHO/WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2018). Dos casos de CCECP estudados por Gillison et al. (2013), mais de três quartos das neoplasias de orofaringe ocorreram em homens, e em 97,7% dos casos, estavam relacionadas especificamente ao HPV-16 (GILLISON et al., 2013).

Uma revisão sistemática e meta-análise das estimativas globais da fração de CCECP HPV positivos, bem como dos tipos de HPV nesses tumores, mostrou que na análise por sítio anatômico e região geográfica, existe uma considerável heterogeneidade entre regiões e países, bem como numa mesma região ou mesmo dentro do mesmo país. A maior prevalência de CCE de cavidade bucal HPV positivos foi observada na Ásia e Américas do Sul e Central, com a menor prevalência na África. Para os tumores de orofaringe, a prevalência de infecção por HPV foi significativamente maior na América do Norte quando comparada com as observadas na Ásia, Oceania e Europa, com as menores taxas sendo observadas nas Américas do Sul e Central. Essas regiões, todavia, foram as que apresentaram a maior prevalência de infecção por HPV para os tumores de laringe, sendo que as menores taxas foram observadas na América do Norte para o referido tumor, conforme apresentado na FIGURA 5 (NDIAYE et al., 2014).

FIGURA 5 - PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HPV EM CCECP POR SÍTIO ANATÔMICO, ESTUDO, PAÍS E REGIÃO GEOGRÁFICA



NOTAS: Laringe inclui casos de hipofaringe. Círculos cheios correspondem a estudos específicos de prevalência. Círculos não preenchidos correspondem a prevalência estimada “combinada” (*pooled*) para a região correspondente. Os tamanhos dos círculos cheios e o dos não preenchidos são proporcionais ao número de casos. Dois estudos apresentaram a informação agregada para *Norway, Sweden e Finland*. Os dados de um estudo com 507 casos foi excluído para a análise regional por apresentar os dados de forma agregada para Europa Central e Américas Central e do Sul.

FONTE: NDIAYE et al., 2014.

Em relação aos tipos de HPV mais encontrados em CCECP, a infecção por HPV-16 tem sido a mais observada em todas as regiões do planeta, com uma prevalência maior em CCE de orofaringe do que a encontrada em cavidade bucal e laringe, para o mesmo tipo de tumor. Para o continente africano, porém, o HPV-18 foi o mais encontrado em CCE de cavidade bucal, sendo o segundo em frequência mundial, seguido pelo HPV-33. Ainda, a proporção de infecções múltiplas ou mistas por HPV foi maior para os CCE de cavidade bucal, laringe e orofaringe, respectivamente (NDIAYE et al., 2014).

2.1.3 Fatores de Risco

Os CCECP apresentam etiologia multifatorial, com fatores como exposição a agentes carcinogênicos, dieta, higiene oral, agentes infecciosos, histórico familiar e doenças pré-existentes podendo, individualmente ou em associação, desempenhar um papel importante como fator etiológico (ANDREOTTI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Dentre os fatores citados, o tabaco é um fator de risco bem estabelecido, estando esse risco relacionado à intensidade e frequência do hábito, não sendo eliminado mesmo após a interrupção do fumo (SCHLECHT et al., 1999; APPLEBAUM et al., 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Ainda, os estudos apontam para uma forte correlação entre mutações relacionadas à proteína p53 (proteína supressora tumoral), na maioria dos pacientes fumantes com CCECP (BRENNAN et al., 1995; HO et al., 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O consumo abusivo de álcool é também um reconhecido fator de risco para CCECP, principalmente para os tumores de hipofaringe (TALAMINI et al., 2002; STURGIS et al., 2004). O álcool tem como metabólito o acetaldeído, molécula que induz a formação de adutos exocíclicos de DNA que interferem na síntese e reparo do DNA, magnificando de maneira sinérgica os efeitos do tabaco ((TALAMINI et al., 2002; BROOKS; THERUVATHU, 2005).

A exposição excessiva à radiação solar ultravioleta sem proteção, pode ao longo dos anos, representar um fator de risco para o câncer de lábio (REZENDE et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Fatores como dieta pobre em frutas e vegetais e má higiene bucal, também estão sendo avaliados quanto ao seu papel no desenvolvimento de CCECP, bem como comportamento sexual, status imunológico, perfil socioeconômico e coinfeções por *Chlamydia trachomatis* e herpesvírus (KOSKELA et al., 2000; PEREIRA et al., 2003; ANDREOTTI et al., 2006; DA SILVA et al., 2007; CASTELLSAGUÉ, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Em meados do ano 2000, um estudo publicado por Gillison e seus colaboradores mostrou que a infecção por HPV poderia representar não apenas mais um fator de risco, mas sim, que os tumores de orofaringe poderiam ser considerados como subtipo dos CCECP, uma vez que tinham início nas camadas mais profundas das amígdalas, apresentavam o DNA do vírus no núcleo das células, mas não nas células vizinhas, o número de mutações relacionadas à proteína p53 (proteína supressora tumoral) era menor quando comparado aos tumores HPV negativos, apresentavam menor associação com o tabaco e o álcool e melhores taxas de sobrevida (CHANG et al., 1993; GILLISON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009).

De fato, os fatores de risco tradicionais como longa exposição ao tabaco e consumo abusivo de álcool, parecem não contribuir na carcinogênese mediada pelo HPV, principalmente para os tumores de orofaringe, quando comparados aos tumores de hipofaringe (D'SOUZA et al., 2007a; PAI; WESTRA, 2009). Os estudos mostram que os CCECP associados ao HPV estão diretamente relacionados com a infecção oral por HPV e certas práticas sexuais que facilitam a exposição contínua ao vírus, como início precoce da atividade sexual, elevado número de parceiros para sexo vaginal e oral, contato oral-genital e oral-anal frequente, e a não adoção das medidas para a prática de sexo seguro (SMITH et al., 1998; D'SOUZA et al., 2007a; PAI; WESTRA, 2009).

Outros meios menos frequentes de transmissão do HPV descritos são a transmissão vertical durante o nascimento, da mãe para o bebê, e a autoinoculação (ou autoinfecção), relatada pela primeira vez em um menino de 5 anos de idade, com verrugas nas mãos e ânus, causadas por HPV-2, via contato das mãos com o ânus (FRAZIER, 1998; BOSCH et al., 2006).

Além dos fatores de risco para a transmissão viral, outros fatores associados à subsequente malignização celular mediada pelo HPV começaram a ser estudados, uma vez que algumas condições e hábitos que sabidamente alteram a imunidade antitumoral podem também contribuir para a manutenção do vírus na célula, como também para a progressão tumoral. Um exemplo é a maior frequência de detecção do HPV observada em indivíduos HIV positivos quando comparada aos HIV negativos. Ainda, a tendência de permanência do HPV por longos períodos de tempo na cavidade oral (cavidade bucal e orofaringe) dos indivíduos HIV positivos é muito maior (KREIMER et al., 2004; D'SOUZA et al., 2007b).

Outro fator de risco que tem sido avaliado quanto à sua relação com os CCECP é a *marijuana* ou maconha, um psicotrópico obtido a partir da espécie de planta *Cannabis sativa*, que apresenta como principal composto ativo o *Tetrahydrocannabinol* (THC) (WHO, 2016). Estudos mostram uma forte associação entre o consumo da droga e casos de CCECP HPV positivos, com intensidade, duração e anos acumulados de uso da substância como fatores que potencializam tal relação (BERGLUND et al., 1999; GLILLISON et al., 2008). Estudos de resposta imune que utilizaram amígdalas humanas, tecido cerebral de roedores e células de câncer de mama, demonstraram os efeitos imunomoduladores da maconha, e portanto, o seu consumo poderia interferir em todos os estágios da malignização celular induzida pelo HPV, como estabelecimento e manutenção da infecção viral, início, crescimento e metástases tumorais (BERGLUND et al., 1999; ZHU et al., 2000; MCKALLIP et al., 2005; GLILLISON et al., 2008).

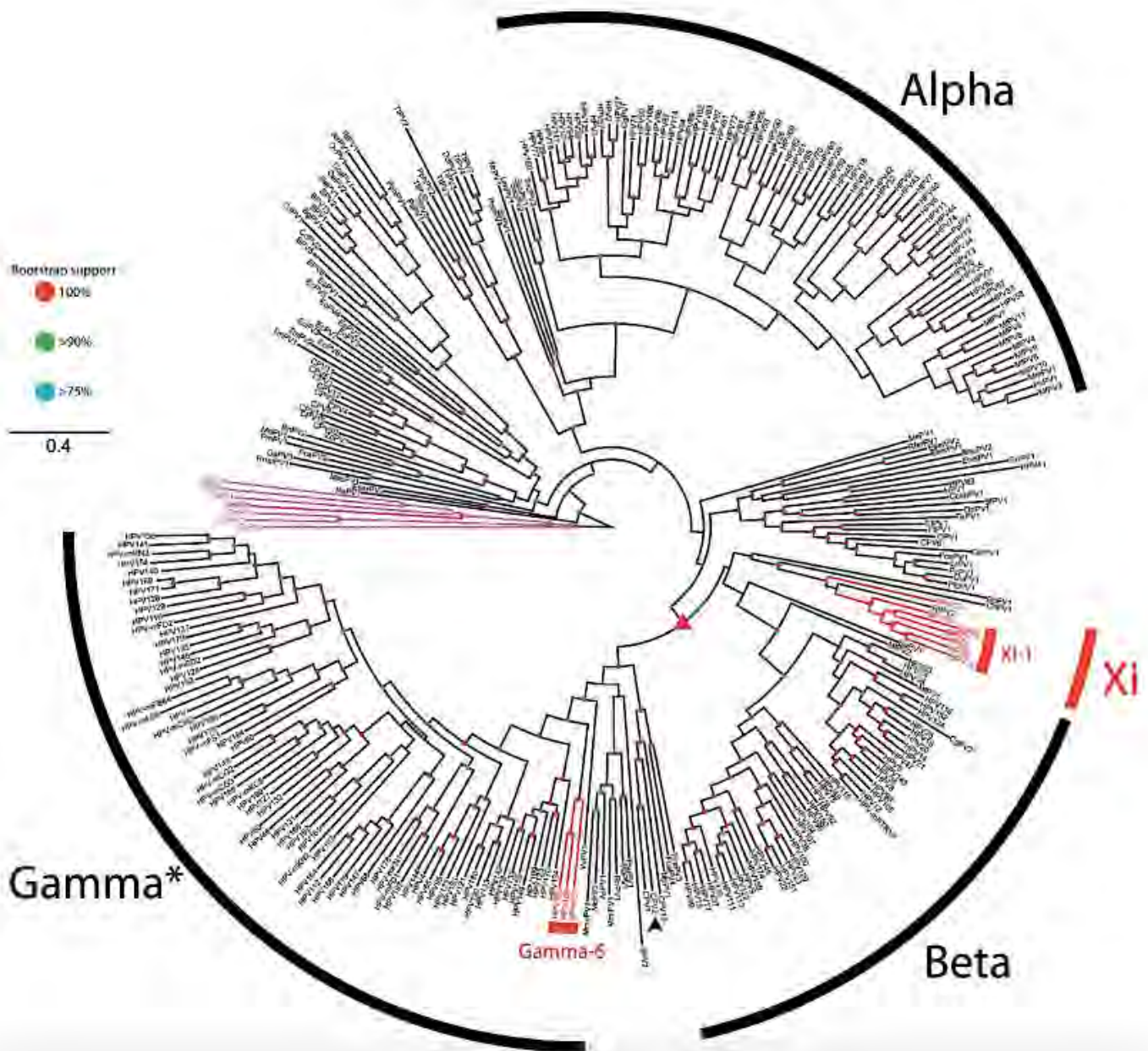
2.2 PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

2.2.1 História Natural da Doença e Ciclo de Vida do Papilomavirus Humano (HPV)

O HPV é um membro da família *Papillomaviridae* que apresenta 16 gêneros diferentes. Tal família é composta por pequenos vírus icosaédricos de DNA dupla fita, com aproximadamente 50 a 60 nanômetros de diâmetro, não envelopados e epiteliotróficos, que infectam os epitélios mucoso e cutâneo de uma grande variedade de vertebrados superiores de forma espécie-específica e induzem a proliferação celular (DE VILLIERS et al., 2004; IARC, 2007; IARC, 2009). Mais de 300 tipos de HPV foram completamente caracterizados à nível molecular, conforme

apresentado na FIGURA 6 (VAN DOORSLAER et al., 2013; VAN DOORSLAER; MCBRIDE, 2016).

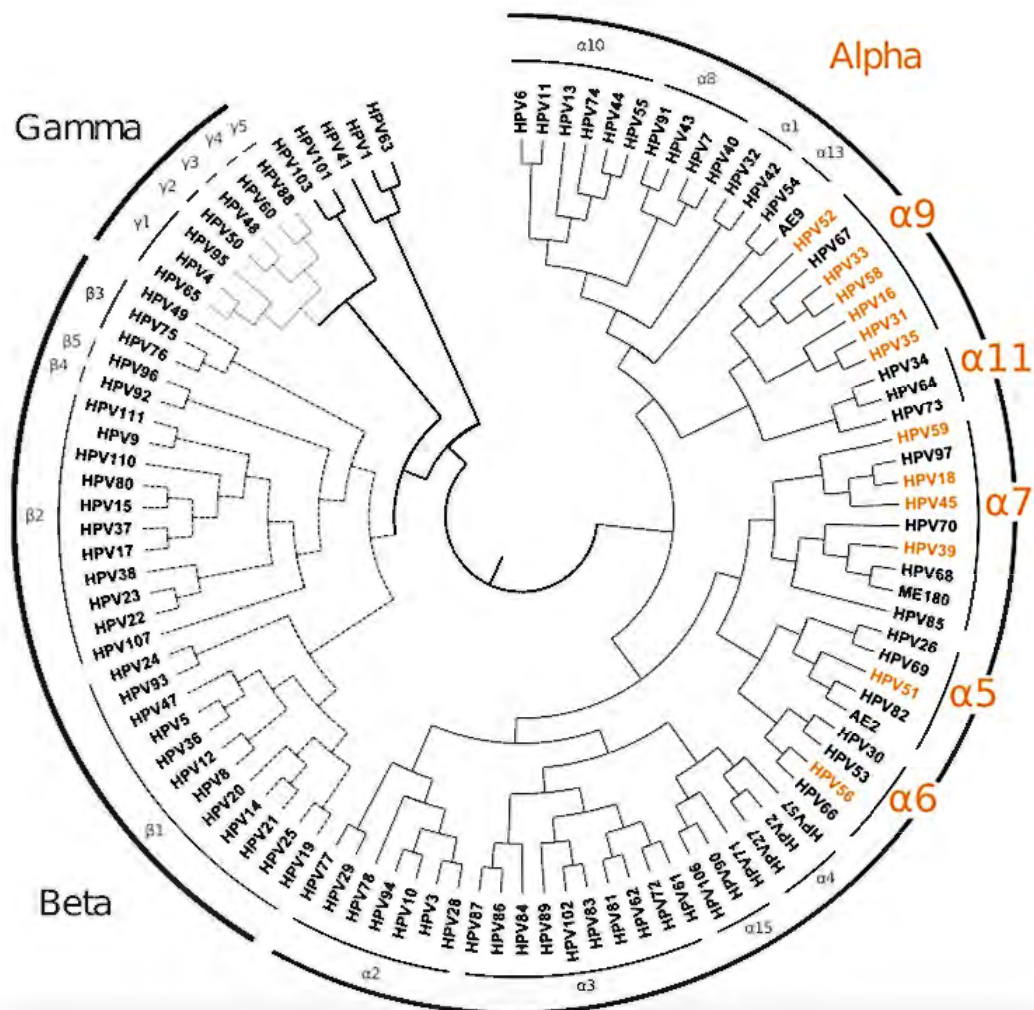
FIGURA 6 - ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO A RELAÇÃO EVOLUTIVA DA FAMÍLIA PAPILLOMAVIRIDAE COM BASE NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DAS REGIÕES E1, E2, L2 E L1



FONTE: VAN DOORSLAER; MCBRIDE (2016).

Considerando apenas os estudos em humanos, mais de 100 tipos de HPV já foram descritos com base na composição nucleotídica do gene *L1*, que codifica a proteína maior do capsídeo viral (DE VILLIERS et al., 2004; IARC, 2007; IARC, 2009). Esses vírus são classificados como do tipo mucoso (cuja maioria é do gênero *alpha*) ou cutâneo (com maioria pertencendo ao gênero *beta*) com base no tropismo para cada epitélio. O gênero *alpha* contém os HPV relacionados ao desenvolvimento de tumores (malignos ou benignos) em tecido epitelial mucoso de humanos, e o gênero *beta*, os HPV associados ao desenvolvimento de tumores (malignos ou benignos) em tecido humano epitelial cutâneo, conforme pode ser observado na FIGURA 7 (IARC, 2007; IARC, 2009; VAN DOORSLAER et al., 2013; VAN DOORSLAER; MCBRIDE, 2016).

FIGURA 7 - ÁRVORE FILOGENÉTICA COM 100 TIPOS DE HPV, DESTACANDO OS TIPOS DE ALTO RISCO DO GÊNERO ALPHA

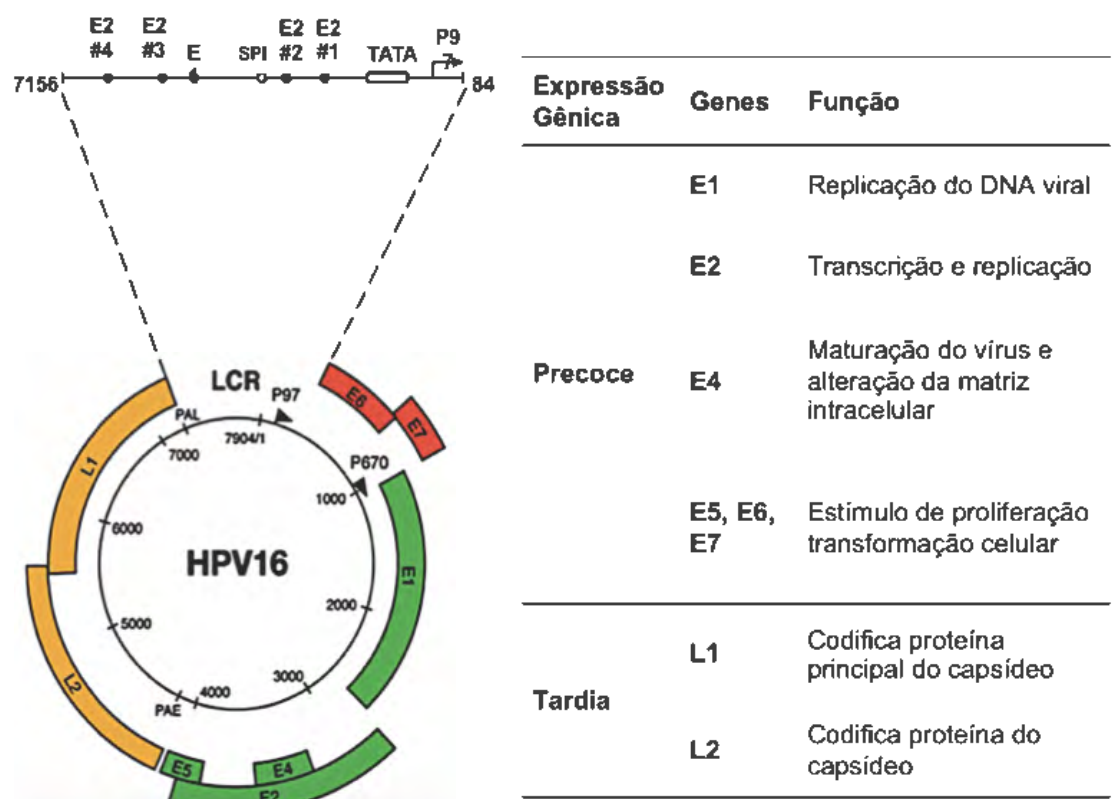


FONTE: IARC (2009).

As partículas do HPV consistem de uma pequena dupla fita de DNA circular

de aproximadamente 7.000 a 8.000 pares de base (pb), que se apresentam de forma cromatinizada (ligada à histonas celulares). O genoma do HPV é dividido em três regiões principais. A primeira é composta por genes de expressão precoce (genes *E1* a *E7*), que são expressos no início do ciclo viral, sendo responsáveis pela regulação da transcrição, replicação plasmidial e transformação. Os genes de expressão tardia codificam as proteínas maior (L1) e menor (L2) do capsídeo viral, que estão envolvidas no empacotamento do genoma do vírus e na liberação da partícula viral. A proteína L1 é capaz de se auto-montar, formando uma estrutura semelhante ao capsídeo viral, as “*virus-like particles*” (VLP), que são a base das vacinas profiláticas contra o HPV (KIRNBAUER et al., 1992; NARDELLI-HAEFLIGER et al., 1997; AIRES et al., 2006). A terceira região do genoma é denominada de Região Longa de Controle (do inglês, *Long Control Region* ou LCR) e contém os elementos reguladores da transcrição e replicação, cuja organização esquemática pode ser observada na FIGURA 8 (MUÑOZ et al., 2006).

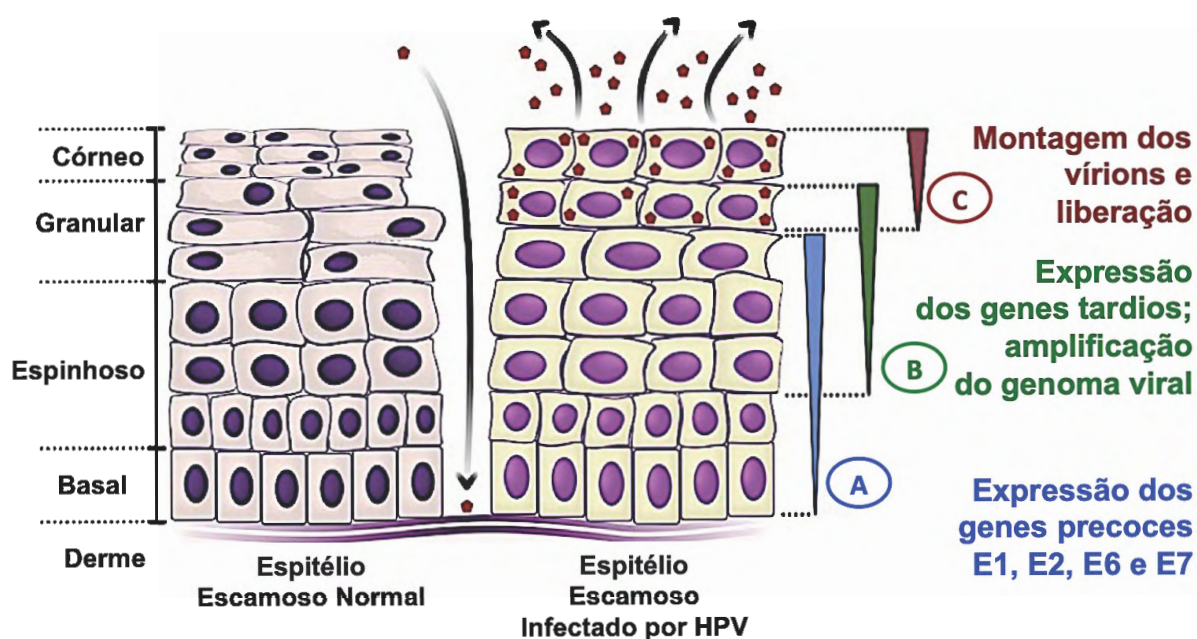
FIGURA 8 - RELAÇÃO ENTRE OS GENES DO HPV E SUAS FUNÇÕES



FONTE: Adaptado de SOUTO et al. (2005), DOORBAR (2006) e DE CAMPOS (2013).

A infecção por HPV, apresentada esquematicamente na FIGURA 9, acontece por meio de micro-traumatismos no epitélio que fazem com que as partículas virais do HPV tenham acesso à camada epitelial basal, e se liguem provavelmente aos receptores de proteoglicanos de heparan sulfato das células em divisão da camada basal (JOYCE et al., 1999; SHAFTI-KERAMAT et al., 2003; PATTERSON et al., 2005). A entrada das partículas de HPV nas células é lenta após a adesão inicial e, para o HPV-16, o processo de endocitose é mediado por clatrina (DAY et al., 2003). Todavia, BOUSARGHIN et al. (2003) sugerem que, para o HPV-31, o acesso ao citoplasma celular seja via *caveolae*. Após a separação dos componentes das partículas virais nos endossomos tardios e/ou lisossomos, a proteína menor do capsídeo L2 promove a transferência do DNA viral para o núcleo, sendo que os primeiros transcritos virais, em sistemas experimentais, podem ser detectados em até 12 horas após a infecção (DAY et al., 2003; DAY et al., 2004).

FIGURA 9 - CICLO DE VIDA DO HPV



FONTE: Adaptado de MOODY; LAIMINS (2010); SOAVE et al. (2013).

Após infectar as células da camada basal do epitélio, o ciclo de vida do HPV pode ser dividido nos estágios de estabelecimento, manutenção e produção. O estabelecimento do estado infeccioso não produtivo ocorre com a entrada da partícula viral na célula hospedeira, a replicação do DNA viral e estabelecimento do genoma do HPV como um plasmídeo (epissomo) nuclear de baixo número de cópias estável (sem integração com o genoma da célula hospedeira), o que provavelmente requer a expressão das proteínas virais E1 e E2 (DELL et al., 2003). A proteína E1 é a única enzima codificada pelo vírus que possui atividade de DNA helicase. Uma vez ligada à origem de replicação viral, a enzima recruta a maquinaria celular de replicação do DNA da célula hospedeira e o processo de duplicação do DNA viral é iniciado. Nesse estágio, apenas as proteínas de expressão precoce são expressas (E1 a E7) (YANG et al., 1993; IARC, 2009).

A proteína E2 também é responsável pelo reconhecimento da origem de replicação e é a principal reguladora da transcrição dos genes virais (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). Além destas funções, a proteína E2 é a que recruta E1 para a origem de replicação viral, e é a responsável por transferir o genoma viral para as células filhas durante a divisão da célula hospedeira. A proteína E4 é a mais abundante proteína viral, mas com função ainda não bem elucidada. Acredita-se que ela esteja ligada com a replicação do DNA viral e com a liberação do vírus (FEHRMANN; LAIMINS, 2003; IARC, 2007; DOORBAR, 2013).

O HPV codifica três oncoproteínas, a saber, E5, E6 e E7. Embora o mecanismo de ação da proteína E5 ainda não seja claro, sabe-se que ela contribui quantitativamente no estágio produtivo do ciclo viral, e está diretamente ligada com a regulação das vias de sinalização dos fatores de crescimento e do escape do vírus da vigilância do sistema imunológico (IARC, 2007; DE FREITAS et al., 2017).

O segundo estágio no ciclo viral do HPV é a manutenção de um estado infeccioso não produtivo, que pode persistir por anos, sendo o pré-requisito para o desenvolvimento de neoplasias malignas no caso dos HPV de alto risco. A permanência neste estágio requer que o genoma seja mantido durante muitas divisões celulares, mecanismo que ainda não é claro (GRAVITT; WINER, 2017).

O estágio produtivo tem início quando as células derivadas da camada epitelial basal começam a se diferenciar. Os oncogenes virais E6 e E7 levam a célula à fase S do ciclo celular, fazendo com que as poucas células infectadas aumentem seu volume, bem como o número de células que produzirão os vírions infecciosos.

As células da camada basal normalmente terminam o ciclo celular e começam o processo de diferenciação terminal para produzir a barreira protetora do epitélio (FEHRMANN; LAIMINS, 2003; MADISON, 2003). Durante esse processo, ocorre a expressão dos genes virais tardios, necessários tanto para a produção das partículas virais como para a liberação das mesmas (IARC, 2007; CONWAY; MEYERS, 2009).

As infecções por HPV são eliminadas, sem qualquer tipo de intervenção, dentro de alguns meses após a infecção e aproximadamente 90% dentro de 2 anos. Todavia, uma pequena proporção de infecções por certos tipos de HPV pode persistir e progredir para a malignização (MUÑOZ et al., 2006; STANLEY et al., 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; WHO, 2018).

De acordo com a capacidade de promover a malignização da célula hospedeira, os HPV são agrupados como de baixo ou alto risco. Destes, os principais representantes são os HPV-16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. Entre os tipos de baixo risco oncogênico encontram-se os HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 (DE VILLIERS et al., 2004). Nas neoplasias malignas da cavidade oral (cavidade bucal e orofaringe), o HPV-16 é tipo mais prevalente, representando mais de 90% da distribuição genotípica encontrada nos tumores de tonsilas palatinas (ST GUILY et al., 2011; KERO et al., 2012).

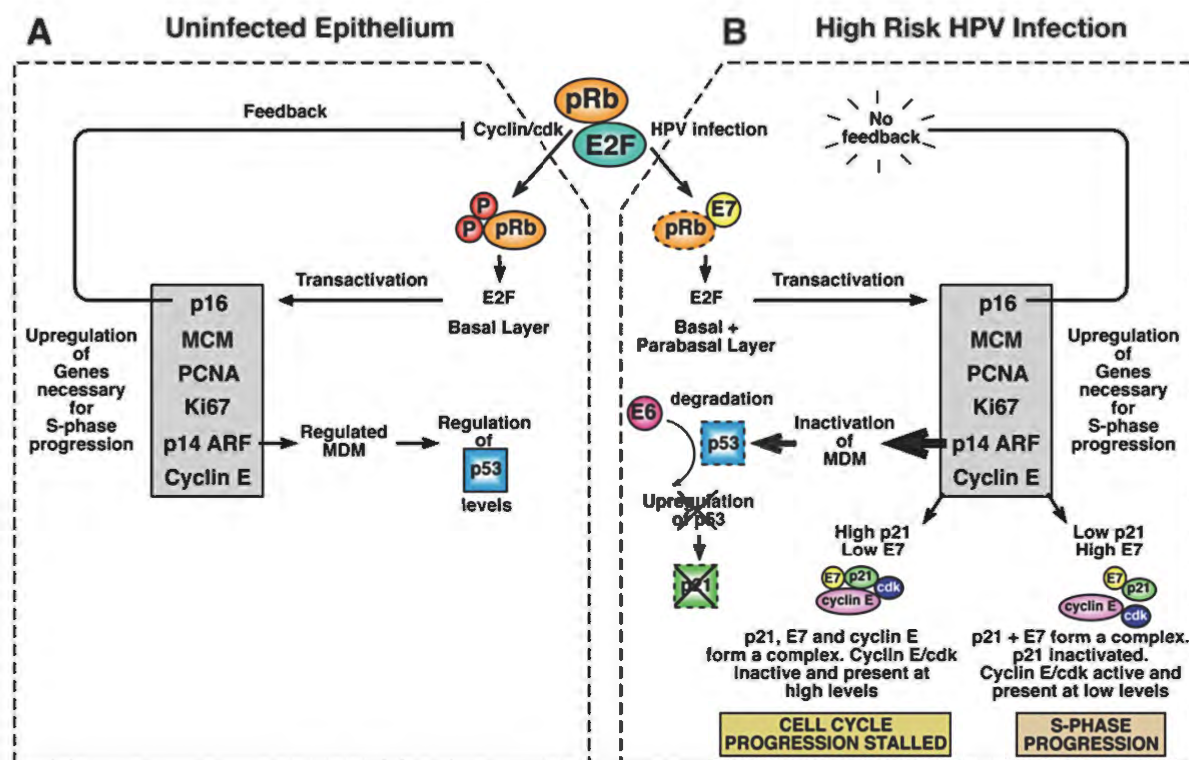
2.2.2 Oncogênese do HPV

Quando a infecção por HPV persiste por longo tempo, existe um aumento no risco de malignização que é dependente do tipo de HPV, dos hábitos de vida, idade e estado imunológico, sendo que o intervalo entre a infecção e o diagnóstico da lesão (benigna ou maligna) pode ser de várias décadas, podendo inclusive ser resultado de um pequeno número de partículas virais (CAMPO, 1995; ZHANG et al., 1999; MOSCICKI et al., 2006; MUÑOZ et al., 2006; STANLEY et al., 2007; THOMAS et al., 2008; GILLISON et al., 2015; LESSEUR et al., 2016; GRAVITT; WINER, 2017).

O potencial carcinogênico do HPV está relacionado, principalmente, à atividade das proteínas E6 e E7, responsáveis pelo processo de imortalização celular. A proteína E6 induz a proteólise mediada por ubiquitina, levando à degradação da proteína p53 (proteína supressora tumoral), e a proteína E7 inativa as proteínas supressoras tumorais da família retinoblastoma (pRb), desregulando o

ciclo celular e levando a célula à imortalização (THOMAS et al., 1999; LIU et al., 2006). Os processos moleculares acima mencionados podem ser visualizados no esquema apresentado na FIGURA 10.

FIGURA 10 - ESTIMULAÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR POR HPV DE ALTO RISCO



NOTAS: ANPC - Antígeno nuclear de proliferação celular; cdk: quinase dependente de ciclina; E2F - Fator de transcrição E2; Ki67 - antígeno nuclear associado ao ciclo celular; MCM - Manutenção de Múltiplas Cópias; MDM - oncoproteína *Murine Double Minute*; p14 FAR - Fator de ADP-ribosilação; pRb - proteína RB.

FONTE: Adaptado de DOORBAR (2006).

Na infecção persistente em colo de útero, e para a maioria dos tumores HPV positivos, o genoma do vírus é integrado ao DNA da célula hospedeira, com ruptura no gene *E2*. Tal ruptura diminuiu o *feedback* negativo da proteína E2 sobre E6 e E7, aumentando assim a expressão das proteínas E6 e E7 (CULLEN et al., 1991; HUDELIST et al., 2004; STANLEY et al., 2007; WOODMAN et al., 2007). Em alguns tumores, entretanto, o gene *E2* se integra ao genoma sem que ocorra a sua ruptura. Ainda, uma porcentagem das neoplasias causadas por HPV-16 não apresenta integração do genoma viral na célula hospedeira (WOODMAN et al., 2007).

Stanley et al. (2007) mostraram que para os CCE de orofaringe, a ruptura do genoma viral durante a integração ocorre em *E1* ao invés de *E2*, como ocorre para

os tumores de colo de útero, e desta forma, contrasta com o modelo no qual a ruptura de *E2* é a responsável pelo aumento na expressão de *E6* e *E7* (STANLEY et al., 2007). Ainda, dados de sequenciamento de genoma completo permitiram a identificação de uma categoria de tumores contendo tanto porções do genoma do HPV quanto do genoma viral completo (NULTON et al., 2017). Todavia, alguns autores argumentam que tais “tumores mistos” representariam na verdade epissomas híbridos contendo os genomas viral e da célula infectada (MORGAN et al., 2017).

Embora os mecanismos moleculares induzidos pelo HPV e responsáveis pelo desenvolvimento de tumores de colo uterino estejam elucidados, não existe ainda um modelo que explique como tais processos ocorrem nos CCECP. Estes e os tumores de colo uterino divergem não apenas quanto à epidemiologia, mas também em relação aos mecanismos moleculares, tipos de HPV envolvidos, padrão de mutações, célula de origem, resposta ao tratamento e comportamento clínico (BERMAN; SCHILLER, 2017).

2.2.3 Perfil dos CCECP HPV positivos

Com a identificação da infecção por HPV como fator de risco para o desenvolvimento de CCECP, vários estudos têm mostrado que a infecção viral em tais tumores modifica o perfil da doença e que os indivíduos acometidos apresentam características epidemiológicas distintas quando comparados àqueles com tumores HPV negativos, conforme apresentado no Quadro 1 (CHANG et al., 1993; GILLISON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009; PAI; WESTRA, 2009).

Nos tumores HPV positivos, a integração do genoma viral ao da célula hospedeira leva à supressão da atividade da proteína p53, mas o gene que expressa a proteína p53 permanece intacto. Já os tumores HPV negativos apresentam mutações no gene da proteína p53, provavelmente em função da exposição a agentes carcinogênicos, e portanto, a proteína p53 produzida não é efetiva em suas funções (XIE et al., 2014). Ainda, levando em consideração o perfil genético e molecular, os tumores HPV negativos apresentam um número muito maior de mutações bem como uma maior variedade das mesmas, como mostram alguns dados de sequenciamento genômico (PAI; WESTRA, 2009; MROZ; ROCCO, 2013).

QUADRO 1 - PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS CCECP HPV POSITIVOS E NEGATIVOS

	CCECP HPV-positivos	CCECP HPV-negativos
Fatores de risco	Práticas sexuais de alto risco	Cigarro e álcool
Sítio do tumor	Tonsilas linguais e palatinas	Sítios não-orofaríngeos
Histopatologia	Basaloide, não queratinizado, pouco diferenciado	Queratinizado, moderadamente diferenciado
Alterações genéticas e moleculares		
Via p53	Degradação da p53 selvagem por E6	Mutações em TP53, 17p LOH
Via Rb	Degradação da Rb selvagem por E7	Hipermetilação do promotor p16 ^{INK4A} , 9p LOH
Resposta a quimioterapia	Melhor	Pior
Prognóstico	Melhor	Pior

NOTAS: HPV – Papilomavírus Humano; LOH – perda da heterozigose; Rb – retinoblastoma.

FONTE: Adaptado de PAI; WESTRA (2009).

Além da degradação da proteína pRB nos tumores HPV positivos, também é observado um aumento da expressão da proteína p16 (proteína que impede a célula de entrar no ciclo celular), o que não é observado para os casos HPV negativos. Este achado tem conduzido o uso da detecção da proteína p16 por imunohistoquímica como biomarcador da presença de infecção por HPV (GONZALES et al., 1995; POETA et al., 2007). Todavia, os resultados de vários estudos mostraram que de 8% a 33% dos tumores de orofaringe com aumento na expressão da proteína p16, não apresentaram infecção por HPV (WASYLYK et al., 2013).

Os tumores HPV positivos, em especial os de orofaringe, apresentam um prognóstico favorável em relação às neoplasias HPV negativas. As taxas de sobrevida em 5 anos para indivíduos com tumores de orofaringe HPV positivos em estágio avançado são de 75% a 80%, enquanto nos casos HPV negativos os valores são inferiores a 50%, o que pode ser parcialmente explicado pelo fato de os tumores HPV positivos responderem melhor tanto a radioterapia quanto a quimioterapia (CHATURVEDI et al., 2008; FAKHRY et al., 2008; ANG et al., 2010).

Estudos apontam para fatores como a alteração de vias de reparação do DNA, diferenças nas vias de sinalização da mitose celular, a perda da regulação do ciclo celular e mudanças no microambiente dos tumores HPV positivos como

possíveis explicações para a maior sensibilidade a radiação (BRUMBAUGH et al., 2004).

Entre os tipos de CCECP HPV positivos, os estudos mostram que mais de 90% dos CCE de orofaringe são causados pelo HPV-16, sendo este também um reconhecido fator de risco para os CCE de base de língua (GILLISON et al., 2000; BEGUM et al., 2005; KREIMER et al., 2005; GILLISON et al., 2012a; GILLISON et al., 2012b). Assim, com a diminuição no consumo do tabaco, a infecção por HPV-16 tornou-se um importante fator de risco e está alterando o perfil demográfico dos CCECP, com pacientes mais jovens e não usuários de tabaco e álcool (D'SOUZA et al., 2007a).

Uma associação positiva, foi também demonstrada entre a infecção por HPV-6 e o risco para o desenvolvimento de CCECP, independente da utilização de tabaco e álcool (FURNISS et al., 2009). Para os demais tipos de HPV, todavia, não há evidências sobre o papel dos mesmos e outros sub-sítios anatômicos dos CCECP (GILLISON et al., 2012b). Alguns estudos mostram que o desfecho clínico é significativamente melhor nos casos de CCE de orofaringe relacionados ao HPV, mas não houve consistência nos resultados quando os demais sítios anatômicos foram avaliados (RAGIN; TAIOLI, 2007; FAKRY et al., 2008; ANG et al., 2010).

Ainda em relação ao perfil epidemiológico dos tumores HPV positivos, observa-se uma maior prevalência em indivíduos jovens (abaixo de 45 anos), com histórico de múltiplos parceiros sexuais e práticas sexuais de risco (GILLISON et al., 2008; PAI; WESTRA, 2009; SCUDELLARI et al., 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; ESMO, 2017).

2.3 TRATAMENTO DOS CCECP

As opções de tratamento dos CCECP são amplas e estão diretamente relacionadas ao tipo e estágio do tumor. A evolução, prognóstico e qualidade de vida do paciente vão depender do tempo decorrido entre os primeiros sinais e sintomas, como dor, disfagia, nódulo cervical, sangramento e dificuldades na abertura bucal, e a realização do correto diagnóstico e início do tratamento. Deve-se ter em mente, entretanto, que muitos casos são assintomáticos em seus estágios iniciais, podendo mimetizar condições benignas comuns da boca, comprometendo assim o diagnóstico precoce e atrasando o início do tratamento (INCA, 2018).

Dependendo do estadiamento, o tratamento dos CCECP pode ser cirúrgico (CX), quimioterápico (QT), radioterápico (RT), ou combinações entre estes métodos. O estadiamento é definido de acordo com as regras da Classificação TNM, uma classificação para tumores malignos desenvolvida por Pierre Denoix, na França, entre os anos de 1943 e 1952 (DENOIX, 1952). Tal sistema tem sido atualizado e ampliado desde então e divide os tumores em estadios, de acordo com as seguintes regras: a letra T indicando a extensão do tumor primário, a letra N indicando a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais, e a letra M indicando a ausência ou presença de metástase à distância. Após cada letra, um número de 0 a 4 é adicionado, indicando a extensão da lesão (UICC, 1992; BRASIL, 2004; HUANG; O'SULLIVAN, 2017).

No Brasil, todas as modalidades de tratamento são oferecidas de forma integral e gratuita, nas Unidades habilitadas na Rede de Alta Complexidade em Oncologia do Sistema Único de Saúde (SUS). Embora muitos avanços tenham sido alcançados ao longo dos anos, a desarticulação das ações e serviços ainda predomina. O impacto advindo da ausência de mecanismos eficazes de regulação e ordenamento do fluxo de usuários, é observado não apenas em termos de custos para o Sistema, mas especialmente na fragmentação do cuidado, atrasando o diagnóstico e início do tratamento (INCA, 2018).

Durante as duas últimas décadas, muito se tem discutido sobre o fato de que os tumores de cabeça e pescoço HPV positivos podem ser considerados como entidades distintas dentro da classe de tumores de cabeça e pescoço, por apresentarem um prognóstico consideravelmente melhor quando comparados aos tumores HPV negativos, com melhor resposta à quimioterapia e quimioradioterapia, além de apresentarem melhores taxas de sobrevida global e sobrevida livre da doença (FRAKHRY et al., 2008; ANG et al., 2010; CMELAK et al., 2014; DAS et al., 2015; MACHIELS et al., 2015).

A relação do HPV com as lesões pré-malignas e neoplasias de cabeça e pescoço já está bem estabelecida, mas os mecanismos moleculares da carcinogênese mediada pelo HPV ainda não são bem compreendidos. Ainda, o conhecimento da prevalência da infecção oral por HPV, da distribuição dos genótipos de HPV, bem como da proporção dos tumores de cabeça e pescoço causados pelo HPV pode variar substancialmente entre as diferentes regiões geográficas. Assim, a detecção precoce, associada ao estudo das características demográficas,

epidemiológicas e clínicas do paciente são fatores importantes, não apenas no estabelecimento do prognóstico e determinação da conduta clínica, mas também na instituição de medidas efetivas de prevenção, com enfoque na atenção primária.

No Brasil, os estudos do perfil da infecção por HPV nos CCECP estão em fase inicial, com poucos dados, principalmente relacionados à prevalência e características populacionais. Até o momento, não há estudos que apresentem dados relacionados à infecção por HPV em CCECP na população atendida no Hospital Erasto Gaertner (HEG), instituição de referência para o diagnóstico e tratamento de neoplasias no estado do Paraná, localizada na cidade de Curitiba-PR. Desta forma, este estudo tem como objetivo determinar a prevalência de infecção do HPV e descrever os diferentes genótipos de HPV, bem como avaliar associação entre a presença do DNA de HPV e as características demográficas, epidemiológicas e clínicas em CCECP, da população atendida no HEG.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os genótipos de HPV detectados em lesões tumorais de Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (CCEP).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência de HPV em material incluído em parafina de pacientes com CCEP.
- Padronizar a genotipagem de HPV por meio de sequenciamento nucleotídico viral dos produtos da PCR.
- Comparar os segmentos obtidos com sequências de referência para análise genotípica do HPV.
- Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com CCEP.
- Correlacionar as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes infectados com os diferentes genótipos de HPV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras Utilizadas no Estudo

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de tecidos incluídos em parafina, com diagnóstico de CCECP, dos anos 2010, 2013 e 2014, disponíveis no Serviço de Patologia do HEG, localizado na cidade de Curitiba, PR.

Para a padronização da técnica de detecção e clonagem molecular do HPV, foram utilizadas 2 amostras de biópsias de tecido fresco de papiloma laríngeo, do ano de 2015, disponíveis no Serviço de Endoscopia Peroral do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Para a seleção da amostra, foi realizada revisão dos prontuários dos pacientes atendidos no serviço de Cabeça e Pescoço do HEG.

Critérios de inclusão

- amostras clínicas provenientes de material incluído em parafina de pacientes com diagnóstico de CCECP, dos anos 2010, 2013 e 2014, disponíveis no Serviço de Patologia do HEG, independente da faixa etária ou doença de base.

Critérios de exclusão

- casos com ausência de amostra incluída em parafina.
- casos com material insuficiente para a realização da pesquisa.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Dados Clínicos e Demográficos

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos a partir de prontuários, sendo que as variáveis clínico-demográficas retiradas dessa seleção foram: o número de identificação, data de nascimento, sexo, cor da pele, estado civil, escolaridade, tabagismo, consumo de álcool, bem como o sítio primário da lesão (lábio e cavidade bucal, orofaringe, laringe e outros sítios anatômicos de cabeça e pescoço), o estadiamento clínico dos pacientes (segundo sistema TNM), o grau de diferenciação do tumor (segundo a Organização Mundial de Saúde: bem, moderadamente e pouco diferenciado), tipo de tratamento (CX, QT, RT e combinações) e evolução clínica (óbito) (UICC, 1992; BRASIL, 2004).

Os dados obtidos foram compilados no *software* Microsoft® Excel® para MacOS 2011 (Versão 14.7.7), para a obtenção da planilha utilizada para as análises estatísticas (MICROSOFT CORPORATION, 2018). O instrumento utilizado para a coleta de dados pode ser visualizado no ANEXO 1.

4.2.2 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva, analítico, observacional, em que não foram realizadas intervenções no atendimento dos pacientes. Foram avaliadas 130 amostras clínicas provenientes de material incluído em parafina de pacientes com CCECP, armazenadas no Serviço de Patologia do HEG.

4.2.3 Aspectos Éticos

Este estudo está de acordo com a Resolução CNS 466/12 com aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Complexo Hospital de Clínicas (HCH) – Universidade Federal do Paraná (UFPR) e do Hospital Erasto Gaertner (HEG) / Liga Paranaense de Combate ao Câncer (ANEXOS 2, 3 e 4), conforme registro abaixo:

- Comitê de Ética em Pesquisa do CHC-UFPR (ANEXO 2)
CAAE: 45066715.0.0000.0096
Parecer nº: 1.101.574
Data da aprovação: 10/06/2015
- Comitê de Ética em Pesquisa do CHC-UFPR (ANEXO 3)
CAAE: 45066715.0.0000.0096
Parecer nº: 1.342.916
Data da aprovação: 30/11/2015
- Comitê de Ética em Pesquisa do HEG / Liga Paranaense de Combate ao Câncer (ANEXO 4)
CAAE: 45066715.0.3001.0098
Parecer nº: 1.508.287
Data da aprovação: 20/04/2016

4.2.4 Métodos Moleculares

4.2.4.1 Extração de DNA

4.2.4.1.1 Extração de DNA de amostras de biópsia de tecido fresco

As amostras de biópsia de tecido fresco foram submetidas à extração do DNA com a utilização de reagentes comerciais (Kit QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante. Após a extração, as amostras com o DNA extraído foram quantificadas por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Estas amostras foram posteriormente utilizadas para a padronização da técnica de detecção e clonagem molecular do HPV, pois o rendimento do material genético extraído de tecido fresco é maior, e apresenta maior qualidade quando comparado ao material genético extraído de tecido incluído em parafina, gerando *amplicons* com maior número de pares de base.

4.2.4.1.2 Extração de DNA de tecido incluído em parafina utilizando xilol

A partir do material obtido de biópsias das lesões selecionadas, previamente fixado em formol 10% e incluído em parafina, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram coletados em tubos de polipropileno de 1,5 ml e homogeneizados vigorosamente com 750 µl de Xilol, por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm. Após a remoção do sobrenadante, os cortes foram hidratados com 500 µl de etanol 100%, e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos e, novamente, após remoção do sobrenadante, foram acrescentados 500 µl de etanol 50%, e os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tecido seco foi submetido a extração do DNA com a utilização de reagentes comerciais (Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue, QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante.

Após a extração, as amostras com o DNA extraído foram quantificadas por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

4.2.4.2 Amplificação do controle interno

Para controle interno das amostras com DNA extraído a partir do material obtido de biópsias das lesões selecionadas, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para o gene da β-globina humana, com os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) GH20/PC04 (BELL et al., 1993), conforme apresentado no Quadro 2. O fragmento da PCR de aproximadamente 264 pares de base (pb) foi analisado em gel de agarose 1%.

QUADRO 2 - INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA B-GLOBINA HUMANA

GENE	LOCALIZAÇÃO	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'– 3')	TAMANHO
β-globina	Cromossomo 11	GH20	5' - GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'	264 pb
	p15.5	PC04	5' - CAACTTCATCCACGTTCCACC - 3'	

FONTE: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI (1988), BELL et al. (1993).

4.2.4.2.1 PCR para o gene da β -globina humana

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica o gene da β -globina humana, foi utilizado o seguinte protocolo:

PCR:

- 5 μ L do DNA extraído (100ng concentração final);
- 1 μ L (10 μ M) de cada um dos iniciadores (GH20 e PC04), que amplificam uma região de aproximadamente 264 pb do gene da β -globina humana;
- 5 μ L do tampão (10X PCR *Buffer*);
- 1,5 μ L (1,5mM) MgCl₂;
- 1 μ L (200 μ M) de dNTP's;
- 0,25 μ L de enzima (Platinum® PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen, contendo 1,25U *Taq*DNA polimerase Platinum®);
- Água ultrapura para completar o volume final de 50 μ L.

A PCR foi realizada em termociclador (Veriti 96-*well*, Applied Biosystems ®) com as seguintes condições de termociclagem:

- Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos
 - Hibridização dos iniciadores a 55°C por 30 segundos
 - Extensão a 72°C por 1 minuto
 - ∞ 4°
- } 35 ciclos

4.2.4.3 Detecção molecular do HPV

Para detectar a presença do HPV no material genético extraído, foi realizada PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) SB01/SB02 (COSER et al., 2011), MY09/MY11 (BAUER et al., 1993), e GP5+/GP6+ (JACOBS et al., 1995), descritos no Quadro 3.

QUADRO 3 - INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *L1* DO HPV

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'–3')	TAMANHO
<i>L1</i>	SB01*	5'- CAA WTR TTY AAT AAR CCW TAT TGG - 3'	493 pb
	SB02*	5'- AAA AAY TTY CGW CCM ARR GG - 3'	
	MY09#	5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC - 3'	460 pb
	SB02*	5'- AAA AAY TTY CGW CCM ARR GG - 3'	
	MY09#	5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC - 3'	451 pb
	MY11#	5'- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG - 3'	
	GP5+	5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACY AC - 3'	150 pb
	GP6+	5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C - 3'	

NOTA: pb = pares de base; W = A ou T; R = A ou G; Y = C ou T; M = A ou C. FONTE: #BAUER et al. (1993), JACOBS et al. (1995), *COZER et al. (2011).

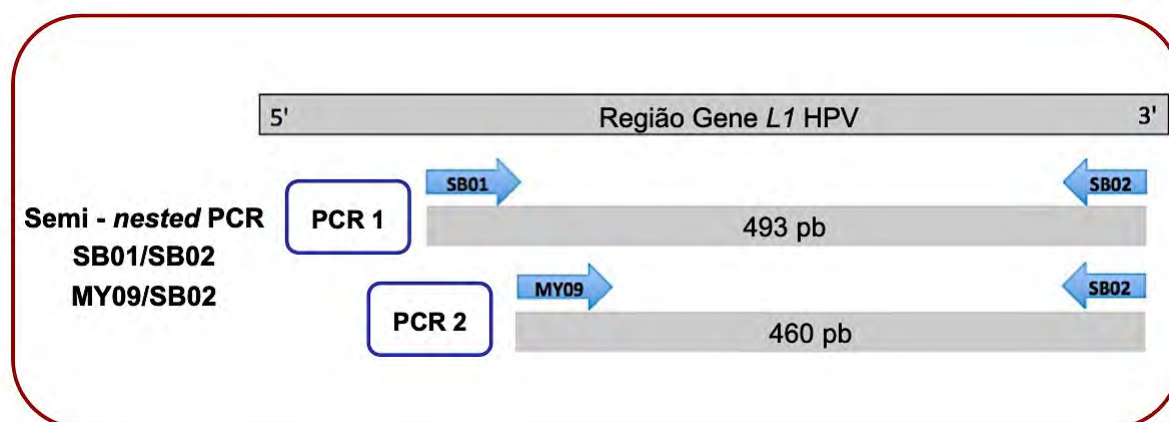
Três estratégias foram utilizadas para amplificar a região do genoma que codifica a proteína estrutural *L1* (*L1 gene*): técnica de *semi-nested* PCR, técnica de *nested* PCR e técnica de *PCR touchdown*.

4.2.4.3.1 Técnica de *semi-nested* PCR

A técnica de *semi-nested* PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) SB01/SB02 para a 1ª PCR, conforme descrito por COZER et al. (2011) e os iniciadores (*primers*) MY09/SB02 para a reação da 2ª PCR, gerando um fragmento de 460 pb, descritos no Quadro 3 e apresentados na FIGURA 11.

Esta técnica foi utilizada para a padronização da técnica de detecção e clonagem molecular do HPV nas amostras de biópsia de tecido fresco, em função do maior rendimento e melhor qualidade que as mesmas apresentam quando comparadas às amostras de tecido incluído em parafina, gerando *amplicons* com maior número de pares de base.

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO DO GENE *L1* DO HPV AMPLIFICADA PELOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES SB01/SB02 E MY09/SB02



FONTE: Adaptado de BAUER et al. (1993), COZER et al. (2011).

4.2.4.3.1.1 PCR para o gene *L1*

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) de amplificação do gene *L1* do HPV, foi utilizado o seguinte protocolo:

1ª PCR:

- 5µL do DNA extraído (100ng concentração final);
- 1µL (10µM) de cada um dos iniciadores (SB01 e SB02), que amplificam uma região mais externa à região alvo;
- 5µL do tampão (10X PCR Buffer);
- 1,5µL (1,5mM) MgCl₂;
- 1µL (200µM) de dNTP's;
- 0,25µl de enzima (Platinum® PCR SuperMix High Fidelity–Invitrogen, contendo 1,25U TaqDNA polimerase Platinum®);
- Água ultrapura para completar o volume final de 50 µL.

A PCR foi realizada em termociclador (Veriti 96-well, Applied Biosystems®) com as seguintes condições de termociclagem:

- Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos
 - Hibridização dos iniciadores a 45°C por 30 segundos
 - Extensão a 72°C por 1 minuto
 - ∞ 4°C
- } 35 ciclos

2ª PCR:

- 3µL do produto da primeira PCR;
- 1µL (10µM) de cada um dos iniciadores (MY09 e SB02), que amplificam uma região mais interna do genoma viral amplificado na primeira PCR, gerando um fragmento de 460 pb.
- 5µL do tampão (10X PCR *Buffer*);
- 1,5µL (1,5mM) MgCl₂;
- 1µL (200µM) de dNTP's;
- 0,25µl de enzima (Platinum® PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen, (contendo 1,25U *Taq*DNA polimerase Platinum®);
- Água ultrapura para completar o volume final de 50 µL.

A PCR foi realizada em termociclador (Veriti 96-*well*, Applied Biosystems®) com as seguintes condições de termociclagem:

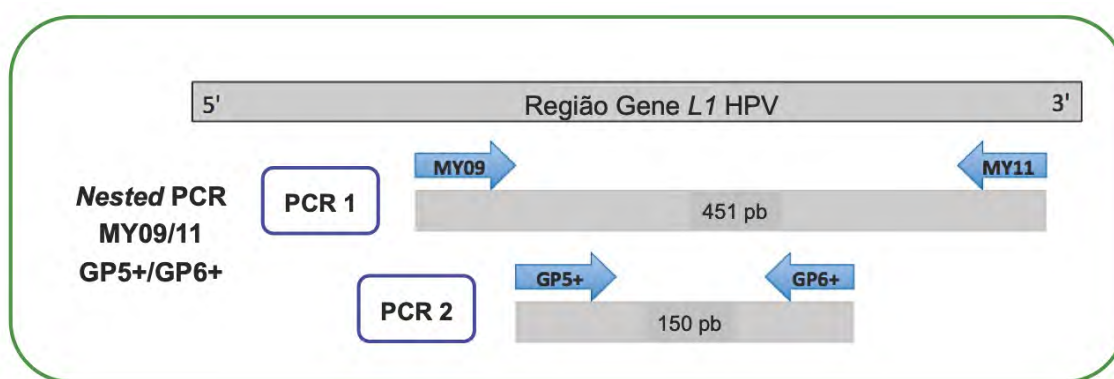
- Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos
 - Hibridização dos iniciadores a 50°C por 30 segundos
 - Extensão a 72°C por 1 minuto
 - ∞ 4°C
- } 35 ciclos

Após a realização da amplificação, 10µL do material foram aplicados em um gel de agarose 1% corado com reagente comercial (EasyView®, Dongsheng Biotech Co., Ltd) para visualização do produto de 460 pb para o gene *L1*. Este produto foi purificado e utilizado na reação de sequenciamento nucleotídico, e após análise filogenética, utilizado para a obtenção do clone para controle positivo das reações.

4.2.4.3.2 Técnica de *nested* PCR

A técnica de *nested* PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) MY09/MY11 (BAUER et al., 1993) e GP5+/GP6+ (JACOBS et al., 1995), descritos no Quadro 3 e apresentados na FIGURA 12.

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO DO GENE *L1* DO HPV AMPLIFICADA PELOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES MY09/MY11 E GP5+/GP6+



FONTE: Adaptado de BAUER et al. (1993), JACOBS et al. (1995).

4.2.4.3.2.1 PCR para o gene *L1*

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) de amplificação do gene *L1* do HPV, foi utilizado o seguinte protocolo:

1ª PCR:

Foram utilizados os mesmos reagentes, concentrações e volumes para a 1ª PCR da técnica de *semi-nested* PCR, bem como termociclador (Veriti 96-well, Applied Biosystems®) e condições de termociclagem descritos no item 4.2.4.3.1.1.

2ª PCR:

- 3µL do produto da primeira PCR;
- 1µL (10µM) de cada um dos iniciadores (GP5+ e GP6+), que amplificam uma região mais interna do genoma viral amplificado na primeira PCR, gerando um fragmento de 150 pb.
- 5µL do tampão (10X PCR *Buffer*);
- 1,5µL (1,5mM) MgCl₂;
- 1µL (200µM) de dNTP's;
- 0,25µl de enzima (Platinum® PCR SuperMix High Fidelity, Invitrogen, (contendo 1,25U *Taq*DNA polimerase Platinum®);
- Água ultrapura para completar o volume final de 50 µL.

A PCR foi realizada em termociclador (Veriti 96-*well*, Applied Biosystems®) com as seguintes condições de termociclagem:

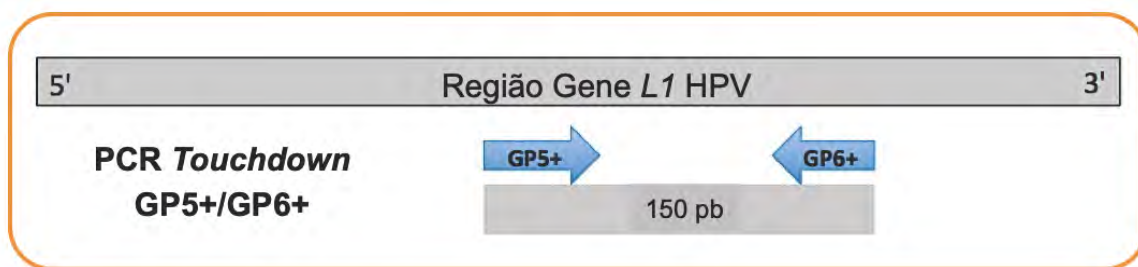
- Desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos
 - Hibridização dos iniciadores a 40°C por 2 minutos
 - Extensão a 72°C por 1 minuto
 - ∞ 4°C
- } 35 ciclos

Após a realização da amplificação, 10µL do material foram aplicados em um gel de agarose 1% corado com reagente comercial (EasyView®, Dongsheng Biotech Co., Ltd) para visualização do produto de 451 pb para o gene *L1*. Este produto foi purificado e utilizado na reação de sequenciamento nucleotídico.

4.2.4.3.3 Técnica de PCR *touchdown*

A técnica de PCR *touchdown* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) GP5+/GP6+ (JACOBS et al., 1995), descritos no Quadro 3 e apresentados na FIGURA 13.

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO DO GENE *L1* DO HPV AMPLIFICADA PELOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES GP5+/GP6+



FONTE: Adaptado de JACOBS et al. (1995).

Esta técnica foi utilizada para a detecção do HPV nas amostras de tecido incluído em parafina, pois o material genético extraído sob tais condições apresenta-se em menor quantidade e com maior grau de degradação, dificultando a obtenção de *amplicons* com mais de 150 pares de base, como aqueles obtidos com as técnicas de PCR previamente citadas.

Foram utilizados os mesmos reagentes, concentrações e volumes para a 1ª PCR da técnica de *semi-nested* PCR, bem como termociclador (Veriti 96-well, Applied Biosystems®), descritos no item 4.2.4.3.1.1. As condições de termociclagem foram as descritas para o PCR *touchdown* TDP4 (EVANS et al., 2005):

- Desnaturação inicial a 94°C por 2 minuto
 - Desnaturação a 94°C por 1 minuto
 - Hibridização dos iniciadores de 55°C a 40°C com
 - Diminuição de 1°C por ciclo, por 2 minutos
 - Extensão a 72°C por 1,5 minuto
 - Desnaturação a 94°C por 1 minuto
 - Hibridização dos iniciadores a 40°C por 2 minutos
 - Extensão a 72°C por 1,5 minuto
 - Extensão final a 72°C por 4 minutos
 - ∞ 4°C
- { 16 ciclos
 { 24 ciclos

4.2.4.4 Purificação do produto de PCR

O produto obtido na PCR foi purificado utilizando-se kit comercial (PureLink® Viral RNA/DNA Kits, Invitrogen), obedecendo às especificações do fabricante. Essa etapa é necessária para remoção de excesso de dNTP e iniciadores, além de permitir mensurar a quantidade de DNA que foi purificado e avaliar a qualidade da purificação. A quantificação foi realizada por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoDrop®ND-1000, Thermo Fisher Scientific) e uma concentração final de 30ng de DNA foi usada para o sequenciamento nucleotídico viral.

4.2.4.5 Reação de Sequenciamento Nucleotídico e Análise Filogenética

O sequenciamento nucleotídico das amostras foi realizado pelo conforme descrito por Sanger et al. (1977). A reação de marcação fluorescente foi realizada em microplaca de 96 poços, utilizando kit comercial (Kit Big Dye, kit ABIPrisms™, Thermo Fisher Scientific), segundo especificações do fabricante. Para isso foram feitas duas reações para cada amostra, utilizando os *primers* MY09 e SB02 ou GP5+ e GP6+ para a região do gene *L1* do HPV, com as seguintes condições de termociclagem:

- Desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto
 - Desnaturação a 96°C por 15 segundos
 - Hibridização dos iniciadores a 50°C por 15 segundos
 - Extensão a 60°C por 4 minutos
- } 35 ciclos

O produto da reação de marcação fluorescente foi então precipitado e lavado utilizando-se uma solução de NaOAc (acetato de sódio) e etanol. O sobrenadante foi descartado e o sedimento desnaturado foi solubilizado com 10µL de formamida HiDi (Applied Biosystems Inc., CA). O DNA foi desnaturado a 96°C por cinco minutos e as amostras mantidas em gelo até o processo de sequenciamento nucleotídico, conduzido em sequenciador (ABI3500, Applied Biosystems).

A sequência consenso da amostra de tecido fresco foi utilizada para a análise de genótipo por meio dos *softwares* MEGA6.06 (<http://www.megasoftware.net>, TAMURA et al., 2013), PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010) e FigTree v1.4.2 (RAMBAUT, 2007).

Para todas as amostras com sequências mistas, a análise foi realizada por meio da ferramenta *on line* Mixed Sequence Reader (CHANG et al., 2012).

4.3 OBTENÇÃO DE CLONES DE HPV-11 PARA CONTROLE POSITIVO DAS AMOSTRAS TESTADAS

4.3.1 Meios de Cultura e Condições de Cultivo

A estirpe de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) foi cultivada em meio Luria Broth (LB) e LA. O meio LB (SAMBROOK et al., 1989) contém triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 10 g/L e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 mol/L. O meio LA apresenta a mesma composição do meio LB com a adição de ágar 15 g/L. O antibiótico utilizado foi a ampicilina (100 µg/mL). As culturas de *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% e estocadas à -70° C.

4.3.2 Clonagem do Gene *L1* do HPV-11 em Vetor de Alto Número de Cópias

4.3.2.1 Reação de ligação

A reação de ligação do produto de PCR do gene *L1* do HPV-11 com o vetor pGEM-T easy® foi realizada a 16° C por 16 horas. Foram utilizados 200 ng do DNA e 50 ng do vetor pGEM-T easy® (Promega), 5U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e tampão de reação 1X, em um volume final de 20µL.

4.3.2.2 Transformação de bactérias competentes

Um volume de 10 µL do produto da reação de ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* TOP10 (Invitrogen) termocompetentes. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, submetida a choque térmico (42° C) por 2 minutos e novamente incubada em gelo por 5 minutos. Após a adição de 350 µL de meio LB, a mistura foi incubada a 37° C por 90 minutos e plaqueada em meio LA, contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37° C por 16 horas.

4.3.2.3 Seleção de clones recombinantes

Após o período de incubação, algumas colônias brancas resistentes (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram selecionadas a fim de realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais.

As colônias previamente selecionadas foram repicadas, individualmente, em tubos estéreis para cultivo de bactérias contendo 5 mL de meio LB líquido contendo 3 µL de ampicilina a 100 µg/mL (pré-inóculo). Os tubos foram incubados a 37^o C por 16 horas, sob agitação de 250 rpm.

4.3.2.4 Mini-preparações plasmidiais

As células tiveram seus DNAs plasmidiais isolados com a utilização de reagentes comerciais (Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems, Promega). A seleção prévia dos recombinantes foi realizada por meio de reação de PCR (item 4.2.4.3). A confirmação dos recombinantes foi realizada por meio de reação de sequenciamento de DNA (item 4.2.4.5).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas por meio de estatística descritiva e analítica. Os dados foram compilados utilizando-se o *software* Microsoft® Excel® para MacOS 2011 (Versão 14.7.7), para a obtenção da planilha utilizada para as análises estatísticas e analisados por meio do *software* GraphPad Prism versão 8.2.1 (MICROSOFT CORPORATION, 2018; GRAPHPAD PRISM, 2019). Teste de qui-quadrado ou teste de Fisher foram utilizados para analisar as diferenças entre os grupos, enquanto o teste de Mann-Whitney foi empregado para as variáveis contínuas, quando apropriado. Foi adotado intervalo de confiança de 95% e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

O perfil clínico-epidemiológico dos 130 casos de CCECP avaliados neste estudo pode ser visualizado na Tabela 1. Os dados mostram que a mediana de idade foi de 60 anos, sendo maior o número de casos diagnosticados a partir da quinta década de vida (76,2%, n=99). O maior número de casos ocorreu em homens (86,9%, n=113) e 79,2% (n=103) apresentaram cor da pele branca.

Os dados referentes ao estado civil e nível de escolaridade mostram que 85,4% (n=111) dos pacientes possuíam o ensino básico, e mais da metade da população avaliada declarou-se casada ou em união estável representando 56,2% (n=73) dos casos.

O consumo de tabaco foi relatado por 86,2% (n=112) dos pacientes, e o de álcool em 70% (n=91) dos casos, sendo que a associação dos dois hábitos ocorreu em 53,8% (n=70) dos casos.

Considerando os sítios anatômicos, lábio e cavidade bucal somados foram os sítios anatômicos de maior número de casos (59,2%, n=77), seguidos pelas neoplasias de laringe (25,4%, n=33) e de orofaringe (8,5%, n=11), respectivamente.

Em relação ao estadiamento e grau de diferenciação, a maior parte dos tumores era de estadiamento T3 e T4, 47,7% (n=62) dos tumores eram bem diferenciados e 43,8% (n=57) eram moderadamente diferenciados.

O tratamento combinado (CX e QT ou CX e RT ou QT e RT, CX e QT e RT) foi utilizado em 80% (n=104) dos casos e o número total de óbitos foi 79 (60,8%).

TABELA 1 - PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS 130 CASOS DE CCEP ANALISADOS, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014

Característica	Categoria	Total	
		n	%
Idade	Mediana	60	—
	IIQ	15,75	—
	Faixa etária		
	≤50	31	23,8
	>51	99	76,2
Sexo	Masculino	113	86,9
	Feminino	17	13,1
Cor da pele	Branca	103	79,2
	Não branca	27	20,8
Estado civil	Casado ou união estável	73	56,2
	Outros	57	43,8
Escolaridade	Básico ou não alfabetizado	121	93,1
	Superior	9	6,9
Consumo de tabaco	Sim	112	86,2
	Não	6	4,6
	SI	12	9,2
Consumo de álcool	Sim	91	70
	Não	21	16,2
	SI	18	13,8
Consumo de álcool e tabaco	Sim	70	53,8
	Não	60	46,2
Sítio do tumor	Lábio e cavidade bucal	77	59,2
	Orofaringe	11	8,5
	Laringe	33	25,4
	Outras regiões	9	6,9
	SI	1	0,8
Sítios do tumor na cavidade bucal	Língua e assoalho bucal	51	66,2
	Mandíbula, maxila, palato, rebordo alveolar, trigono retromolar, mucosa jugal	25	32,5
	Não especificado	1	1,3
Estadiamento do tumor [#]	Tis, T1, T2	30	23,1
	T3, T4	80	61,5
	SI	20	15,4
Grau de diferenciação do tumor	Bem e moderadamente diferenciado	119	91,5
	Pouco diferenciado e <i>in situ</i>	10	7,7
	SI	1	0,8
Tratamento*	Único	26	20
	Combinado	104	80

Característica	Categoria	conclusão	
		Total n	%
Óbito	Sim	79	60,8
	Não	51	39,2

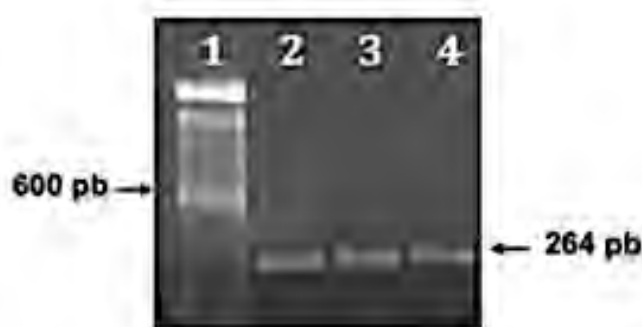
NOTAS: #Conforme Sistema de Classificação de Tumores Malignos – TNM (UICC, 1992; BRASIL, 2004); IIQ = intervalo interquartil; Tis = carcinoma *in situ*; T1, T2, T3 e T4 = tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário; *Tratamento único = CX ou QT ou RT; *Tratamento combinado = CX e QT ou CX e RT ou QT e RT, CX e QT e RT; CX = cirurgia; QT = quimioterapia; RT = radioterapia. FONTE: A autora (2019).

5.2 MÉTODOS MOLECULARES

5.2.1 Extração de DNA de Amostras de Biópsia de Tecido Fresco e Padronização da Técnica Extração de DNA de Tecido Incluído em Parafina Utilizando Xilol

A extração de DNA de tecido fresco e de tecido incluído em parafina utilizando xilol foi realizada conforme descrito nos itens 4.2.4.1.1 e 4.2.4.1.2. A qualidade das amostras após a extração do DNA foi verificada por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da β -globina humana (item 4.2.4.2.1). A amplificação do gene da β -globina humana pode ser visualizada na FIGURA 14.

FIGURA 14 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA B-GLOBINA HUMANA, POR PCR, DA AMOSTRA DE TECIDO FRESCO E DA AMOSTRA DE MATERIAL INCLUÍDO EM PARAFINA



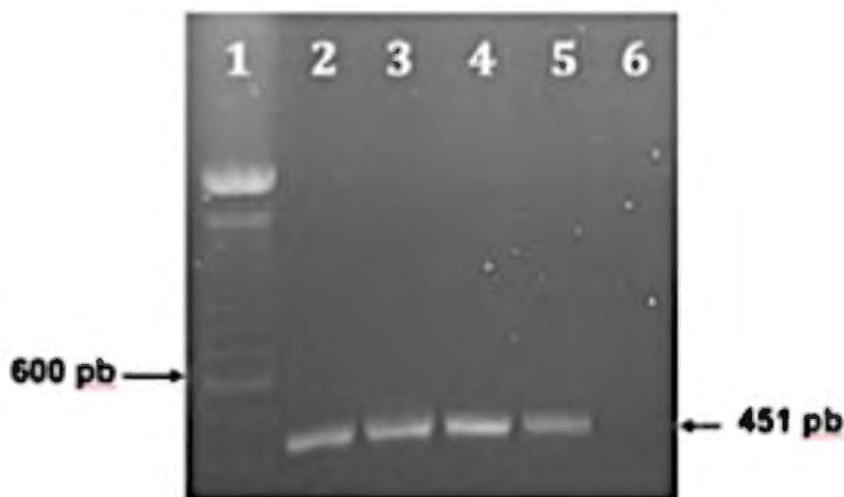
NOTAS: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) evidenciando os produtos de amplificação do gene da β -globina humana por PCR. Linha 1 – Marcador de peso molecular (100 pb DNA *ladder*, Invitrogen®); linha 2 – Produto de PCR do gene da β -globina humana com aproximadamente 264 pb da amostra 1 (biópsia de tecido fresco); linha 3 – Produto de PCR do gene da β -globina humana com aproximadamente 264 pb da amostra 2 (material incluído em parafina); linha 4 – Controle positivo da reação de PCR para o gene da β -globina humana com aproximadamente 264 pb. O gel foi corado com reagente comercial (EasyView®, Dongsheng Biotech Co., Ltd) e visualizado em aparelho de fotodocumentação (UVP®, Analytik Jena) com *software* correspondente.

FONTE: A autora (2019).

5.2.2 Padronização da Amplificação do Material Genético do HPV

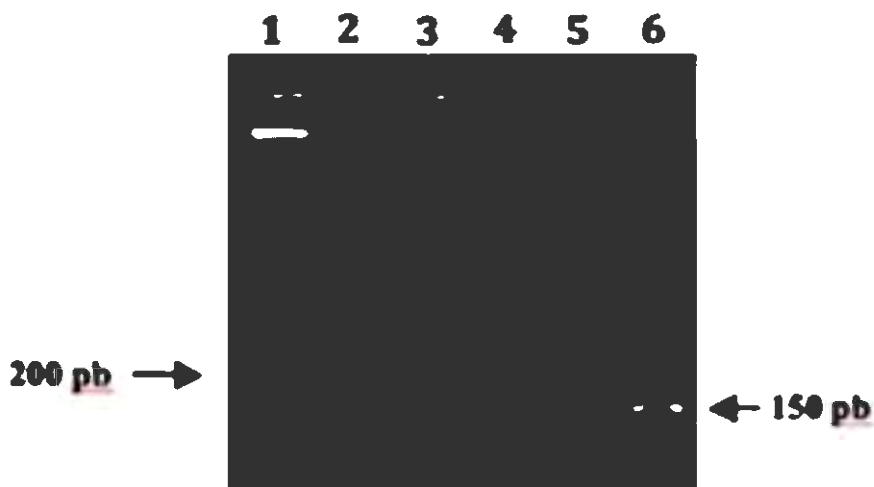
Para detectar a presença do HPV no material genético extraído, foram utilizadas três estratégias para amplificar a região conservada do genoma do HPV que codifica a proteína estrutural L1 (gene *L1*), conforme descrito nos itens 4.2.4.3.1 a 4.2.4.3.3. A amplificação pode ser visualizada nas FIGURAS 15 e 16.

FIGURA 15 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *L1* DO HPV, POR PCR, DAS AMOSTRAS 1 (TECIDO FRESCO) E 2 (MATERIAL INCLUÍDO EM PARAFINA)



NOTAS: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) evidenciando os produtos de amplificação do gene *L1* do HPV. Linha 1 – Marcador de peso molecular (100 pb DNA *ladder*, Invitrogen®); linha 2 – Produto da 2ª PCR do gene *L1* do HPV com 451 pb amostra 1 (biópsia de tecido fresco); linha 3 – Produto da 2ª PCR do gene *L1* do HPV com 451 pb amostra 2 (material incluído em parafina); linha 4 – Controle positivo da reação de PCR para o gene *L1* do HPV com 451 pb; linha 5 – Controle positivo da reação de PCR para o gene *L1* do HPV com 451 pb; linha 6 – Controle negativo da reação de PCR para o gene *L1* do HPV. O gel foi corado com reagente comercial (EasyView®, Dongsheng Biotech Co., Ltd) e visualizado em aparelho de fotodocumentação (UVP®, Analytik Jena) com *software* correspondente. FONTE: A autora (2019).

FIGURA 16 - AMPLIFICAÇÃO DO GENE *L1* DO HPV, POR PCR, UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES GP5+/GP6+



NOTAS: Eletroforese em gel de agarose (2,0%) evidenciando os produtos de amplificação do gene *L1* do HPV. Linha 1 – Marcador de peso molecular (100 pb DNA *ladder*, Invitrogen®); linhas 2 a 6 – Produto da PCR com os iniciadores GP5+/GP6+, do gene *L1* do HPV, com 150 pb; linha 2 – Produto da 2ª PCR (PCR *nested*); linhas 3 – Produto da PCR convencional, conforme descrito por JACOBS et al. (1995); linhas 4 e 5 – Produto da PCR *touchdown* de amostra de material incluído em parafina; linha 5 - Produto da PCR *touchdown* de amostra de tecido fresco. O gel foi corado com reagente comercial (EasyView®, Dongsheng Biotech Co., Ltd) e visualizado em aparelho de fotodocumentação (UVP®, Analytik Jena), com *software* correspondente.

FONTE: A autora (2019).

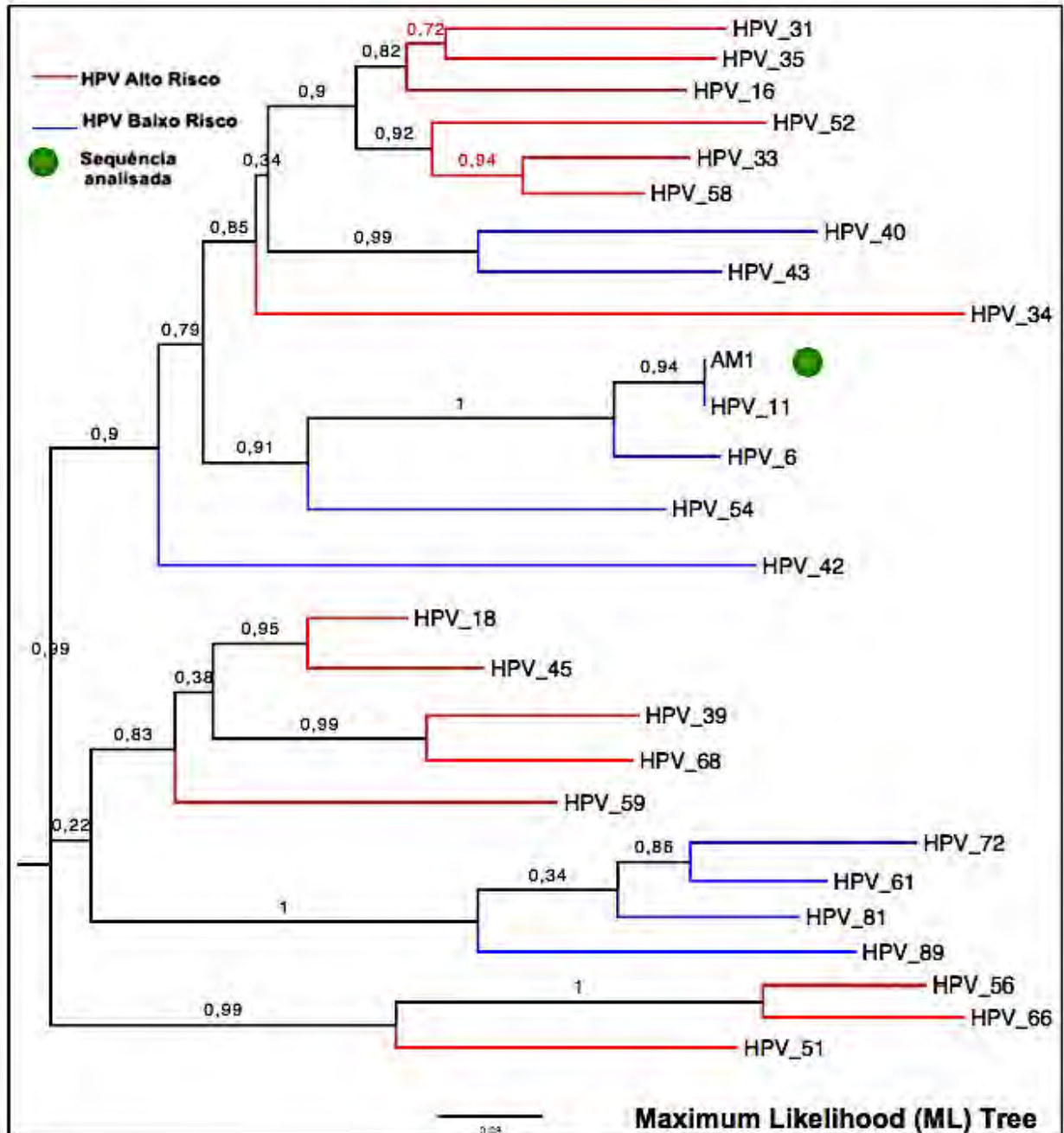
5.2.3 Clonagem do Gene *L1* do HPV-11

O gene *L1* do HPV foi clonado no vetor pGEM-T (Promega) (item 4.3.2) utilizando a técnica de clonagem TA. Esta técnica permite a clonagem direta do fragmento de DNA amplificado, pois a TaqDNA polimerase adiciona uma adenosina na extremidade 3' na dupla fita do amplificado (ZHOU; GOMEZ-SANCHES, 2000). Assim, os fragmentos podem ser unidos a um vetor linearizado com resíduos T protuberantes nas extremidades 3' complementares como vetor pGEM-T (Promega). O plasmídeo recombinante contendo o gene *L1* do HPV-11 inserido no vetor pGEM-T (Promega), foi sequenciado para confirmar a inexistência de mutações no gene eventualmente produzidas durante a PCR.

5.2.4 Padronização da Reação de Sequenciamento Nucleotídico e Análise da Sequência Consenso

A reação de sequenciamento foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.5. Os resultados da análise preliminar da sequência obtida da amostra de biópsia (AM1) são mostrados na FIGURA 17. A sequência consenso foi submetida a análise de subtipagem utilizando-se os softwares MEGA6.06 (<http://www.megasoftware.net>, TAMURA et al., 2013), PhyML 3.0 (GUIDON et al., 2010) e FigTree v1.4.2 (RAMBAUT, 2007).

FIGURA 17 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DA REGIÃO DE 451 PARES DE BASE, AMPLIFICADA POR PCR SEMI-NESTED DO GENE *L1* DO HPV DE AMOSTRA DE BIÓPSIA AM1 (TECIDO FRESCO)

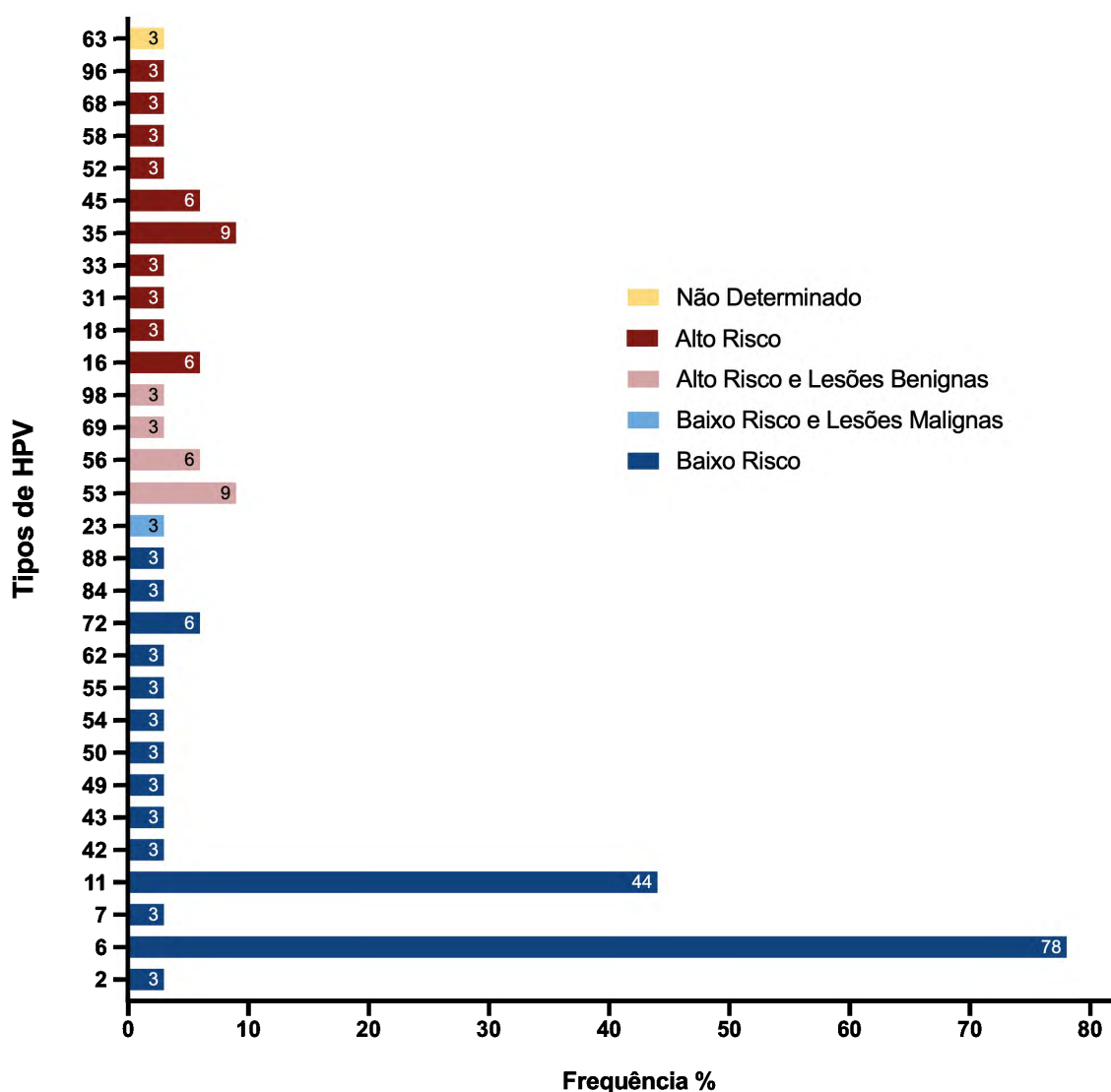


NOTAS: As sequências referência foram obtidas do banco de dados PaVE - *Papillomavirus Episteme* (<http://pave.niaid.nih.gov>). A sequência nucleotídica foi alinhada utilizando-se o software MEGA6.06 (<http://www.megasoftware.net>, TAMURA et al., 2013) e analisada por meio do software FigTree v1.4.2 (RAMBAUT, 2007).

FONTE: A autora (2019).

As sequências que apresentaram perfil múltiplo de infecção foram avaliadas por meio da ferramenta *on line Mixed Sequence Reader* (CHANG et al., 2012). Dos 32 casos HPV positivos, 25% (n=8) eram mono-infecções e 75% (n=24) eram infecções mistas, com mais de um tipo de HPV. Foram identificados 30 tipos de HPV de 3 gêneros distintos, conforme apresentado nas FIGURAS 18 e 19. Os tipos de HPV mais prevalentes foram o HPV-6 (75%, n=24), 11 (44%, n=14), 53 (9,4%, n=3), 35 (9,4%, n=3), 56 (6,3%, n=2), 16 (6,3%, n=2) e 45 (6,3%, n=2).

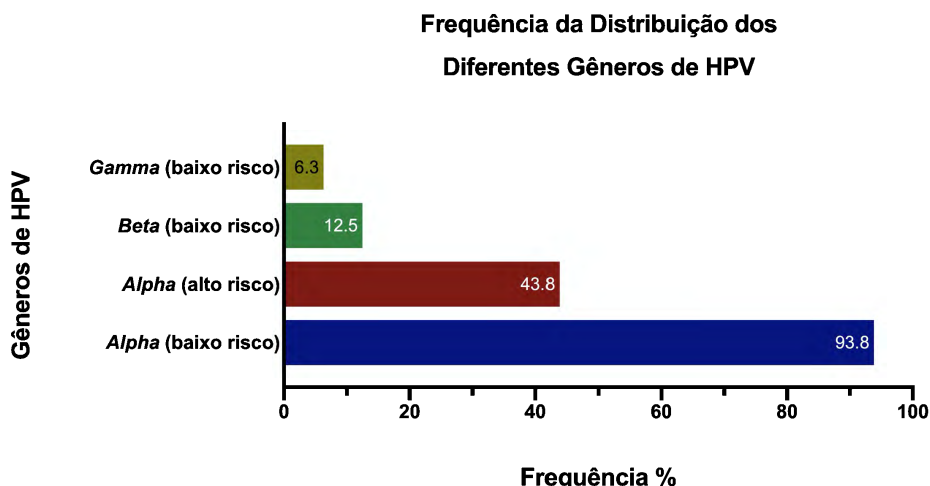
FIGURA 18 - FREQUÊNCIA DOS TIPOS DE HPV ENCONTRADOS NAS 130 AMOSTRAS DE CCECP ANALISADAS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014



NOTAS: Classificação quanto ao risco e tipo das lesões conforme descrito por DE VILLIERS et al. (2004), IARC (2009).

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 19 - FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS DE HPV ENCONTRADOS NAS 32 AMOSTRAS DE CCECP HPV POSITIVAS, ANALISADAS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014



NOTAS: Classificação quanto ao gênero e risco conforme descrito por DE VILLIERS et al. (2004), IARC (2009).

FONTE: A autora (2019).

5.3 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS COM INFECÇÃO POR HPV

5.3.1 Prevalência da Infecção por HPV

Os dados com o perfil clínico e epidemiológico dos casos HPV positivos e negativos estão apresentados na Tabela 2. Para as 130 amostras de CCECP avaliadas, os resultados obtidos mostraram uma prevalência de infecção por HPV de 24,6% (n=32), sendo 84% (n=27) dos casos HPV positivos em homens e 16% (n=5) em mulheres. Em relação à cor da pele, 87% (n=28) dos casos HPV positivos apresentaram cor da pele branca, e 50% (n=16) estavam casados ou em união estável.

Para os casos HPV negativos, o grau de escolaridade de 95,9% (n=94) dos casos foi ensino básico e analfabetos, tendo sido encontrada uma correlação entre o grau de escolaridade e risco de infecção por HPV, sendo a baixa escolaridade um fator de proteção à infecção por HPV (p=0,007; OR: 0,036 a 0,523).

O consumo de álcool e tabaco foi observado em 68,8% (n=22) e 62,5% (n=20) dos casos HPV positivos, respectivamente, sendo a presença dos dois hábitos observada em 62,5% (n=20) dos casos HPV positivos.

Os tumores de lábio e cavidade bucal representaram 59,4% (n=19) dos casos HPV positivos, os de orofaringe 9,4% (n=3) e os de laringe 25% (n=8), sendo que na cavidade bucal, 31,6% (n=6) dos casos HPV positivos eram de tumores de língua.

Os dados referentes ao estadiamento e grau de diferenciação do tumor mostraram que 62,5% (n=20) dos casos HPV positivos eram de estadiamento T3 e T4 e que 90,6% (n=29) eram bem ou moderadamente diferenciados.

Em relação ao tratamento, em 87,5% (n=28) dos casos HPV positivos receberam tratamento combinado (CX e QT ou CX e RT ou QT e RT, CX e QT e RT) e 62,5% (n=20) dos pacientes foram a óbito.

TABELA 2 - PERFIL DE INFECÇÃO POR HPV DOS 130 CASOS DE CCEP ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014

Característica	Categoria	HPV-positivo		HPV-negativo		Valor de p	Odds ratio (OR) 95% IC
		n	%	n	%		
Total de casos		32	24,6	98	75,4	-	-
Idade							
	Mediana	60		60,5		0,713**	—
	IIQ	17,75		15			
	Faixa etária						
	≤50	10	31,3	21	21,4	0,338*	0,663 a 4,046
	>51	22	68,8	77	78,6		
Sexo							
	Homens	27	84	86	87,76	0,763*	0,265 a 2,076
	Mulheres	5	16	12	12,24		
Cor da pele							
	Branca	28	87,5	75	76,5	0,218*	0,727 a 6,14
	Não branca	4	12,5	23	23,5		
Estado civil							
	Casado ou união estável	16	50	57	58,2	0,538*	0,334 a 1,544
	Outros	16	50	41	41,8		

							continua
Característica	Categoria	HPV-positivo		HPV-negativo		Valor de p	Odds ratio (OR) 95% IC
		n	%	n	%		
Escolaridade							
	Básico ou não alfabetizado	26	81,3	94	95,9	0,007*	0,036 a 0,523
	Superior	6	18,8	3	3,1		
Tabaco							
	Sim	22	68,8	90	91,8	0,6*	0,108 a 2,718
	Não	2	6,3	4	4,1		
	SI	8	25	4	4,1		
Álcool							
	Sim	20	62,5	71	72,4	>0,999*	0,352 a 3,573
	Não	4	12,5	17	17,3		
	SI	8	25	10	10,2		
Tabaco e álcool							
	Sim	20	62,5	70	71,4	0,093*	0,175 a 1,005
	Não	12	37,5	18	18,4		
Sítio do tumor							
	Lábio e cavidade bucal	19	59,4	58	59,2	>0,999*	0,222 a 3,295
	Orofaringe	3	9,4	8	8,2		
	Lábio e cavidade bucal	19	59,4	58	59,2	>0,999*	0,384 a 2,651
	Laringe	8	25	25	25,5		
	Lábio e cavidade bucal	19	59,4	58	59,2	>0,999*	0,248 a 5,827
	Outras localizações	2	6,3	7	7,1		
Sítios do tumor na cavidade bucal							
	Língua e assoalho bucal	10	52,6	41	70,7	0,16*	0,149 a 1,288
	Mandíbula, maxila, palato, rebordo alveolar, trigono retromolar, mucosa jugal	5	26,3	9	15,5		
	Não especificado	-	-	1	1,7		

conclusão

Característica	Categoria	HPV-positivo		HPV-negativo		Valor de p	Odds ratio (OR) 95% IC
		n	%	n	%		
Estadiamento do tumor [#]							
	Tis, T1, T2	10	31,3	20	20,4	0,471*	0,574 a 3,849
	T3, T4	20	62,5	60	61,2		
	SI	2	6,3	18	18,4		
Grau de diferenciação do tumor							
	Bem ou moderadamente diferenciado	29	90,6	90	91,8	>0,999*	0,282 a 6,299
	Pouco diferenciado e <i>in situ</i>	2	6,3	8	8,2		
	SI	1	3,1	-	-		
Tratamento [✦]							
	Único	4	12,5	22	22,4	0,31*	0,172 a 1,469
	Combinado	28	87,5	76	77,6		
Óbito							
	Sim	20	62,5	59	60,2	>0,999*	0,47 a 2,525
	Não	12	37,5	39	28,8		

NOTAS: Em negrito: estatisticamente significativo. *teste exato de Fisher (FISHER, 1970); **teste de Mann Whitney (MANN; WHITNEY, 1947); IIQ = intervalo interquartil; SI = sem informação; [#]Conforme Sistema de Classificação de Tumores Malignos – TNM (UICC, 1992; BRASIL, 2004); Tis = carcinoma *in situ*; T1, T2, T3 e T4 = tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário; [✦]Tratamento único = CX ou QT ou RT; [✦]Tratamento combinado = CX e QT ou CX e RT ou QT e RT, CX e QT e RT. CX = cirurgia; QT = quimioterapia; RT = radioterapia. Não foram incluídos na análise os casos sem informações.

FONTE: A autora (2019).

5.3.2 Perfil da Distribuição da Infecção por HPV

Os dados relacionados à prevalência de mono-infecções e infecções múltiplas por HPV, bem como aqueles relacionados aos tipos de HPV encontrados e à distribuição do número de tipos de HPV detectados nas infecções múltiplas, podem ser visualizados nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

Quanto aos dados relacionados ao perfil de distribuição das mono-infecções e das infecções múltiplas por HPV, por sítio anatômico são analisados, observa-se que para as infecções múltiplas, 53,1% (n=17) dos casos HPV positivos em lábio e

cavidade bucal, seguidos pelos casos em laringe com 15,6% (n=5). Para as mono-infecções, o sítio mais prevalente foi a laringe com 9,4% (n=3) dos casos.

Em relação à cor da pele, observa-se que 68,8% (n=22) dos casos HPV positivos com infecção múltipla apresentaram cor da pele branca, sendo que não apresentar cor da pele branca foi um fator de proteção contra infecções por múltiplos tipos de HPV ($p=0,006$, OR: 0,023 a 0,48, IC 95%).

TABELA 3 - PERFIL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO DE MONO-INFECÇÃO E INFECÇÃO MÚLTIPLA POR HPV DOS 32 CASOS DE CCEP HPV POSITIVOS, ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014

							continua
Característica	Categoria	Infecção por HPV				Valor de p	Odds Ratio (OR) (IC 95%)
		Mono		Múltipla			
		n=8 (25%)		n= 24 (75%)			
		n	%	n	%		
Sexo							
	Homens	5	15,6	21	65,6	0,562*	0,061 a 2,522
	Mulheres	2	6,3	3	9,4		
Cor da pele							
	Branca	5	15,6	22	68,8	0,006*	0,023 a 0,48
	Não branca	7	21,9	3	9,4		
Estado civil							
	Casado ou união estável	1	3,1	14	43,8	0,082*	0,0097 a 1,084
	Outros	6	18,8	10	31,3		
Escolaridade							
	Não alfabetizado	1	3,1	1	3,1	NA	—
	Básico	6	18,8	18	56,3		
	Superior	—	—	5	15,6		
Consumo de Tabaco							
	Sim	4	12,5	17	53,1	NA	—
	Não	—	—	2	6,3		
	SI	3	9,4	5	15,6		
Consumo de Alcool							
	Sim	4	12,5	15	46,9	NA	—
	Nunca	—	—	4	12,5		
	SI	3	9,4	5	15,6		

continua

Característica	Categoria	Infecção por HPV				Valor de p	continua Odds Ratio (OR) (IC 95%)
		n	%	n	%		
Consumo de Álcool e Tabaco							
	Sim	4	12,5	16	50,0	NA	—
	Não	—	—	2	6,3		
Sítio do Tumor							
	Lábio e Cavityde Bucal	2	6,3	17	53,1	0,072*	0,003 a 0,826
	Orofaringe	2	6,3	1	3,1		
	Lábio e Cavityde Bucal	2	6,3	17	53,1	0,135*	0,03 a 1,261
	Laringe	3	9,4	5	15,6		
	Lábio e Cavityde Bucal	2	6,3	17	53,1	0,271*	0,005 a 3,29
	Outras Localizações de Cabeça e Pescoço	1	3,1	1	3,1		
Sítio do Tumor na Cavityde Bucal							
	Língua e assoalho bucal	1	3,1	9	28,1	0,999*	0,042 a 18,81
	Lábio, Mandíbula, Maxila, Palato, Rebordo Alveolar, Trígono Retromolar, Mucosa Jugal	1	3,1	8	25,0		
Estadiamento do Tumor [#]							
	Tis, T1 e T2	2	6,3	8	25,0	0,682*	0,102 a 3,735
	T3 e T4	6	18,8	14	43,8		
	SI	—	—	2	6,3		
Grau de Diferenciação do Tumor							
	Bem e moderadamente diferenciado	8	25	21	65,6	NA	—
	Pouco diferenciado e <i>in situ</i>	—	—	2	6,3		
	SI	—	—	1	3,1		

Característica	Categoria	Infecção por HPV				Valor de p	conclusão
		n	%	n	%		Odds Ratio (OR) (IC 95%)
Tratamento [✱]							
	Único	—	—	4	12,5	NA	—
	Combinado	8	25	20	62,6		
Óbito							
	Sim	5	15,6	15	46,9	>0,999*	0,17 a 4,494
	Não	3	9,4	9	28,1		

NOTAS: Em negrito: estatisticamente significativo. *teste exato de Fisher (FISHER, 1970); SI = sem informação; #Conforme Sistema de Classificação de Tumores Malignos – TNM (UICC, 1992; BRASIL, 2004); Tis = carcinoma *in situ*; T1, T2, T3 e T4 = tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário; ✱Tratamento único = CX ou QT ou RT; ✱Tratamento combinado = CX e QT ou CX e RT ou QT e RT, CX e QT e RT. CX = cirurgia; QT = quimioterapia; RT = radioterapia. Não foram avaliados os sem informações.

FONTE: A autora (2019).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DE HPV NAS AMOSTRAS COM MÚLTIPLAS INFECÇÕES POR HPV, DOS 32 CASOS DE CCEP HPV POSITIVOS, ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014

Infecção múltipla por HPV	Total		Nº da amostra	Tipos de HPV
	n	%		
	24	75,0		
2 tipos de HPV	8	33,3		
			2	6 ^a , 11 ^a
			20	6 ^a , 16 ^b
			29	6 ^a , 23 ^c
			40	6 ^a , 49 ^c
			17	6 ^a , 53 ^b
			125	6 ^a , 11 ^a
			49	6 ^a , 72 ^a
3 tipos de HPV	12	50		
			10	6 ^a , 11 ^a , 56 ^b
			16	6 ^a , 11 ^a , 56 ^b
			62	6 ^a , 11 ^a , 56 ^b
			22	6 ^a , 11 ^a , 56 ^b
			52	6 ^a , 11 ^a , 43 ^a
			28	6 ^a , 33 ^b , 63 ^c
			8	2 ^a , 6 ^a , 98 ^c
			24	6 ^a , 42 ^a , 69 ^a
			136	6 ^a , 62 ^a , 63 ^e
			55	6 ^a , 35 ^b , 53 ^a
			13	11 ^a , 45 ^b , 88 ^d
			31	6 ^a , 35 ^b , 45 ^b

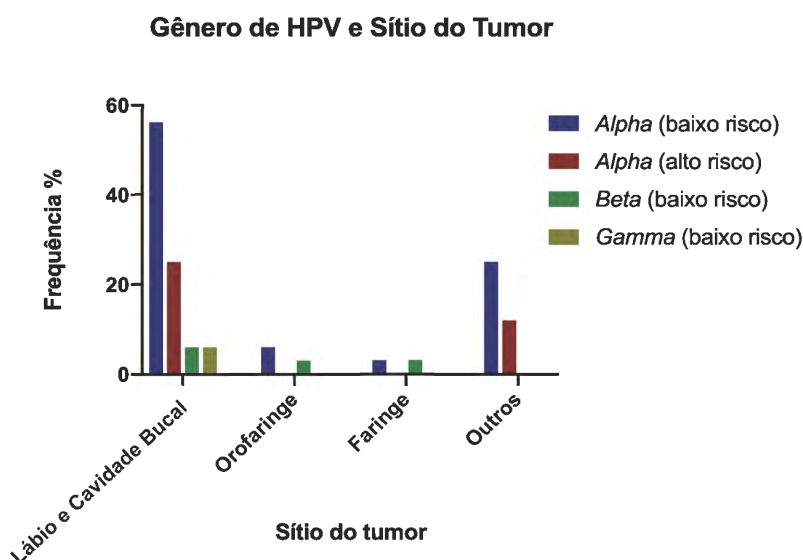
			conclusão	
Infecção múltipla por HPV	Total		Nº da amostra	Tipos de HPV
	n	%		
4 tipos de HPV	5	20,8		
			5	6 ^a , 31 ^b , 54 ^a , 68 ^b
			4	6 ^a , 11 ^a , 35 ^b , 56 ^b
			37	6 ^a , 53 ^b , 72 ^a , 96 ^c
			14	6 ^a , 7 ^a , 11 ^a , 55 ^a
			42	18 ^b , 52 ^b , 58 ^b , 84 ^a

NOTAS: a = *alpha*-papilomavírus de baixo risco; b = *alpha*-papilomavírus de alto risco; c = *beta*-papilomavírus; d = *gamma*-papilomavírus de baixo risco; e = não determinado (DE VILLIERS et al., 2004; IARC; 2009).

FONTE: A autora (2019).

A distribuição dos gêneros de HPV nas diferentes localizações dos CCECP, ou de acordo com estadiamento e grau de diferenciação podem ser visualizadas nas FIGURAS 20 a 22. Lábio e cavidade bucal foram os únicos sítios com infecções por HPV do gênero *gamma*, sendo este gênero observado apenas nas lesões com estadiamento T3 e T4, e em casos bem ou moderadamente diferenciados.

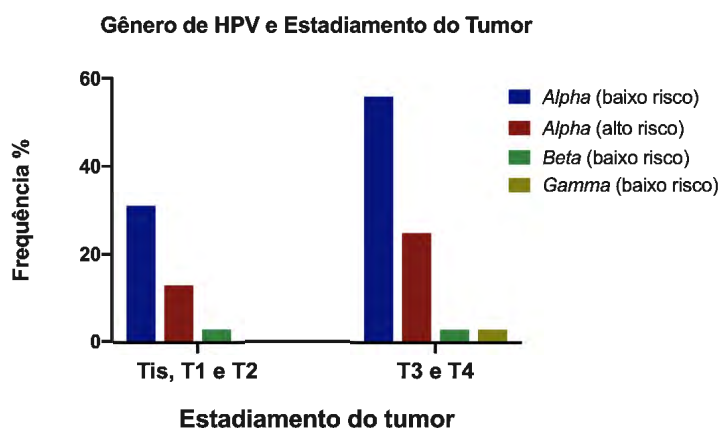
FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS DE HPV NAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES ANATÔMICAS NAS 32 AMOSTRAS DE CCECP, HPV POSITIVAS, ANALISADAS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014



NOTAS: Classificação quanto ao gênero e risco conforme descrito por DE VILLIERS et al. (2004), IARC (2009).

FONTE: A autora (2019).

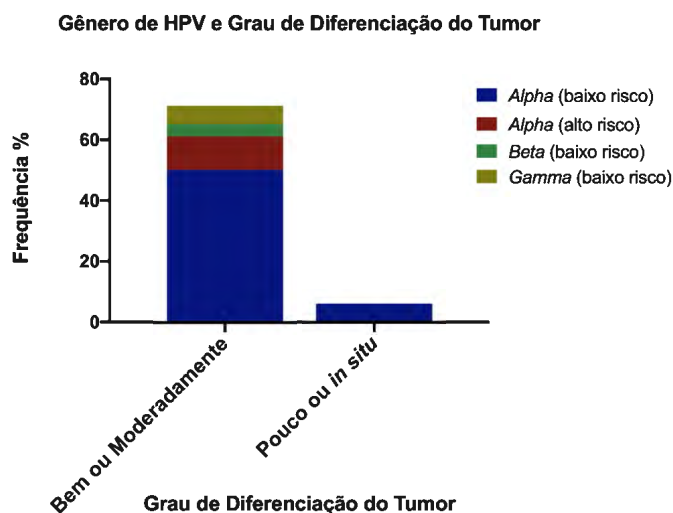
FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS DE HPV DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO DOS 32 CASOS DE CCECP HPV POSITIVOS, ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014



NOTAS: Classificação quanto ao gênero e risco conforme descrito por DE VILLIERS et al. (2004), IARC (2009). Estadiamento do tumor conforme Sistema de Classificação de Tumores Malignos – TNM (UICC, 1992; BRASIL, 2004); Tis = carcinoma *in situ*; T1, T2, T3 e T4 = tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário.

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 22 - DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS DE HPV DE ACORDO COM O GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DOS 32 CASOS DE CCECP HPV POSITIVOS, ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014

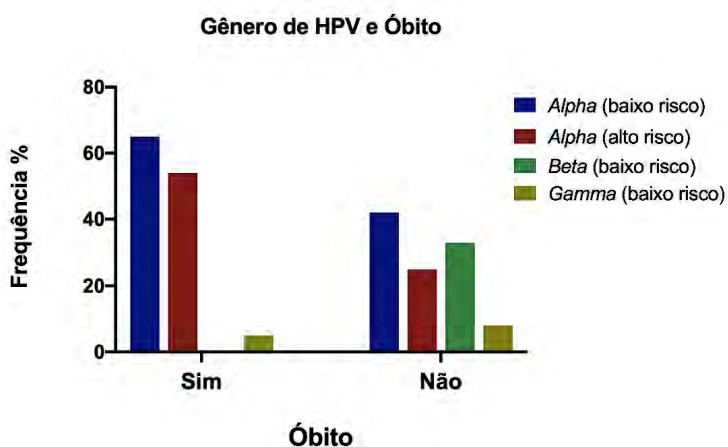


NOTAS: Classificação quanto ao gênero e risco conforme descrito por DE VILLIERS et al. (2004), IARC (2009).

FONTE: A autora (2019).

Em relação ao desfecho clínico, não foram encontradas infecções por HPV do gênero *beta* nos indivíduos que foram a óbito, conforme apresentado na FIGURA 23.

FIGURA 23 - FREQUÊNCIA DE ÓBITO EM RELAÇÃO AOS GÊNEROS DE HPV NOS 32 CASOS DE CCECP HPV POSITIVOS, ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014



NOTAS: Classificação quanto ao gênero e risco conforme descrito por DE VILLIERS et al. (2004), IARC (2009).

FONTE: A autora (2019).

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE TIPOS DE HPV DETECTADOS NAS INFECÇÕES MÚLTIPLAS DOS 130 CASOS DE CCEP ANALISADOS NESTE ESTUDO, DISPONÍVEIS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER, CURITIBA, PR, DOS ANOS 2010, 2013 E 2014

continua

Característica	Categoria	Nº de tipos de HPV detectados nas infecções múltiplas n= 24 (75%)				Valor de p	Odds ratio 95% IC
		2		mais de 2			
		n	%	n	%		
Total		7	29,2	17	70,8		
Idade							
	Mediana (IIQ)		57 (18)		59 (19,5)	>0,9999**	—
Sexo							
	Homens	6	25,0	15	62,8	>0,999*	0,081 a
	Mulheres	1	4,2	2	8,2		13,35
Cor da pele							
	Branca	6	25,0	16	66,7	0,231*	0,012 a
	Não branca	2	8,3	1	4,2		1,98
Estado civil							
	Casado ou União Estável	4	16,7	10	41,7	>0,999*	0,177 a
	Outros	3	12,5	7	29,2		4,651
Escolaridade							
	Básico ou Não Alfabetizado	6	25,0	13	54,2	>0,999*	0,188 a
	Superior	1	4,2	4	16,7		25,94
Consumo de Tabaco							
	Sim	5	20,8	12	50,0	NA	
	Não			2	8,3		
	SI	2	8,3	3	12,5		

							continua		
Característica	Categoria	Nº de tipos de HPV detectados nas infecções múltiplas				Valor de p	Odds ratio 95% IC		
		n= 24 (75%)							
		2		mais de 2					
		n	%	n	%				
Consumo de Álcool									
	Sim	4	16,7	11	45,8	NA			
	Não	1	4,2	—	—				
	SI	2	8,3	3	12,5				
Consumo de Álcool e Tabaco									
	Sim	4	16,7	11	45,8	>0,999*	0,133 a 3,703		
	Não	3	12,5	6	25,0				
Sítio do Tumor									
	Lábio e Cavidade Bucal	4	16,7	13	54,2	NA			
	Orofaringe	1	4,2	—	—				
	Lábio e Cavidade Bucal	4	16,7	13	54,2	>0,999*	0,095 a 18,45		
	Laringe	1	4,2	4	16,7				
	Lábio e Cavidade Bucal	4	16,7	13	54,2	NA			
	Outras Localizações de Cabeça e Pescoço	1	4,2	—	—				
Sítio do Tumor na Cavidade Bucal									
	Língua e Assoalho Bucal	3	12,5	6	25,0	0,576*	0,392 a 51,01		
	Lábio, Mandíbula, Maxila, Palato, Rebordo Alveolar, Trígono Retromolar, Mucosa Jugal	1	4,2	7	29,2				
Estadiamento do Tumor [#]									
	Tis, T1 e T2	3	12,5	5	20,8	>0,999*	0,283 a 9,149		
	T3 e T4	4	16,7	10	41,7				
	SI	—	—	2	8,3				
Grau de Diferenciação do Tumor									
	Bem ou Moderadamente Diferenciado	6	25,0	15	62,5	0,525*	0,019 a 8,779		
	Pouco Diferenciado e <i>in situ</i>	1	4,2	1	4,2				
	SI			1	4,2				

							conclusão
Característica	Categoria	Nº de tipos de HPV detectados nas infecções múltiplas				Valor de p	Odds ratio 95% IC
		n= 24 (75%)					
		n	%	n	%		
Tratamento [✱]	Único	1	4,2	3	12,5	>0,999*	0,052 a 6,278
	Combinado	6	25,0	14	58,3		
Óbito	Sim	4	16,7	11	45,8	>0,999*	0,133 a 3,703
	Não	3	12,5	6	25,0		

NOTAS: *teste exato de Fisher (FISHER, 1970); **teste de Mann-Whitney (MANN; WHITNEY, 1947); SI = sem informação; #Conforme Sistema de Classificação de Tumores Malignos – TNM (UICC, 1992; BRASIL, 2004); Tis = carcinoma *in situ*; T1, T2, T3 e T4 = tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário; ✱Tratamento único = CX ou QT ou RT; ✱Tratamento combinado = CX e QT ou CX e RT ou QT e RT, CX e QT e RT. CX = cirurgia; QT = quimioterapia; RT = radioterapia. Não foram avaliados os sem informações.

FONTE: A autora (2019).

6 DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos mostraram que a população deste estudo era composta majoritariamente por homens, com mediana de idade de 60 anos, e mais da metade dos casos de CCECP sendo diagnosticados a partir da quinta década de vida, concentrando-se entre os 51 e 70 anos de idade. Tal perfil está de acordo com o observado em diferentes regiões do mundo (ALVARENGA et al., 2008; FURNISS et al., 2009; SARAIVA et al., 2016; BRAY et al., 2018; INCA, 2018). Estudos realizados com a população brasileira dos estados do Rio Grande do Norte e de São Paulo também apresentaram o mesmo perfil, com aproximadamente 75% dos casos sendo do sexo masculino e média de idade de aproximadamente 60 anos (FIGUEIREDO et al., 2012; DE SOUSA et al., 2016).

Disparidades relacionadas à cor da pele na prevalência dos CCECP são bem documentadas na literatura, que mostra uma predominância de casos em brancos na incidência da doença na maioria dos países, mas uma predominância de negros nos casos mais graves e com pior prognóstico da doença (SHEN et al., 2015; ZANDBERG et al., 2016). A composição relacionada à cor da pele das amostras avaliadas neste estudo, de aproximadamente 80% dos casos de CCECP tendo ocorrido em casos de cor de pele branca, poderia revelar uma concordância com estudos que relatam uma baixa incidência de tumores de cabeça e pescoço em não brancos quando comparada à população em geral. (NAGHAVY et al., 2016; U.S. CANCER STATISTICS WORKING GROUP, 2016).

Todavia, como existe uma grande variação na classificação da cor da pele nos estudos, análises precisas dessa variável entre os estudos são um desafio. Ainda, os achados deste estudo podem apenas refletir as características de distribuição de cor da pele da população estudada, uma vez que os dados de um estudo em Detroit (EUA), com 121 pacientes diagnosticados com CCE de orofaringe mostraram que aproximadamente 42% dos pacientes apresentaram cor da pele negra (WORSHAM et al., 2013). A literatura também demonstra que, em pacientes de cor de pele negra, a doença se apresenta de forma mais avançada, com demora para o início do tratamento, o que pode ser consequência do suporte social inadequado e desemprego (NAGHAVY et al., 2016).

Os levantamentos em relação ao estado civil trazem, em geral, a correlação das variáveis idade, sexo e cor da pele, acima mencionadas, com o desfecho da

doença. Indivíduos casados apresentam melhor desfecho clínico quando comparados aos não casados, o que provavelmente se deve ao melhor suporte familiar e social, embora também tenha sido demonstrado que a demora para iniciar o tratamento pode ser maior entre os casados na maioria dos relatos (RODAY et al., 2015; OSAZUWA-PETERS et al., 2017).

Quanto à escolaridade, a maior parte dos estudos mostra uma relação inversa entre o risco de CCECP e o os anos de estudo, sendo semelhante ao encontrado neste estudo que mostrou que, aproximadamente 93% dos casos possuíam apenas o ensino básico. Uma revisão sistemática sobre as condições socioeconômicas e câncer de cabeça e pescoço destacou que na Espanha foi identificada uma razão de chance (OR) de 5,6 para tumores de laringe em pacientes com menor escolaridade (UZCUDUN et al., 2002; BOING; ANTUNES, 2011).

Os dados apresentados neste estudo também mostraram que os índices de consumo de tabaco e álcool, ou da associação dos dois hábitos, foi consideravelmente maior em homens, estando de acordo com estudos que sugerem que tal diferença entre os gêneros deve-se, dentre outros fatores, ao fato de que o consumo de tabaco e álcool foi, durante muito tempo, maior em homens quando comparado às mulheres (VLADIMIROV; SCHIODT, 2009). Assim, a composição predominantemente masculina da amostra neste estudo poderia ser reflexo do maior número de tumores em homens causados, ou com grande contribuição, dos carcinogênicos mencionados. Tendo em vista, porém, as mudanças atuais no estilo de vida, com aumento no consumo de tabaco e álcool por mulheres, essa diferença poderá diminuir nos próximos anos (MAYNE et al., 2009; VLADIMIROV; SCHIODT, 2009; PINTO et al., 2011; FERLAY et al., 2019; INCA, 2019).

Além de ser um fator de risco para CCECP, o fato do indivíduo relatar que continua consumindo tabaco, no momento do diagnóstico, está associado a menores taxas de sobrevida, maior risco de tumores secundários no pulmão, esôfago, e possivelmente próstata, bem como risco de comorbidades e outras causas de morte como as doenças cardiovasculares e as doenças pulmonares obstrutivas crônicas (NAGHAVI et al., 2016; FERLAY et al., 2019; INCA, 2019).

Em relação à localização primária do tumor, os dados encontrados neste estudo mostram um maior número de casos em lábio e cavidade bucal, e laringe, respectivamente, sendo semelhantes aos descritos em outros estudos para algumas populações brasileiras, mas diferente das estatísticas nacionais atuais que apontam

o câncer de laringe como o mais frequente (ANTUNES et al., 2001; CASATI et al., 2012; SARAIVA et al., 2016; INCA; 2018). Mundialmente, os sítios primários mais comuns são orofaringe, lábio e cavidade bucal e laringe, com discretas variações na sua ordem de incidência em função da região geográfica e população estudada (NAGHAVI et al., 2016).

O estadiamento do tumor é uma variável de extrema importância ao se considerar aspectos como tratamento e resposta clínica. Neste estudo, 80% dos casos eram de estadiamento T3 e T4, o que indica um diagnóstico tardio, e está de acordo com o observado em outros estudos (BAXI et al., 2014; ANANTHARAMAN et al., 2018). Diversos estudos abordam o fato de que os CCECP normalmente são diagnosticados tardiamente, provavelmente devido à ausência de dor nos estágios iniciais da doença (BRANDIZZI et al., 2008; KREPPEL et al., 2011; SEOANE-ROMERO et al., 2012; BAXI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

O desfecho clínico observado neste estudo, com aproximadamente 60% de mortes, pode ser consequência direta das demais variáveis encontradas e discutidas até agora. A mediana de idade de 60 anos, a baixa escolaridade, o elevado consumo de tabaco e álcool, somados ao diagnóstico tardio, poderiam ser causas de relevada importância da proporção de óbitos encontrada na população avaliada.

Dos diversos fatores de risco para o desenvolvimento de CCECP, a infecção por HPV têm sido extensivamente estudada. Sabe-se que para os tumores de colo de útero, existe uma relação causal direta entre a presença do vírus e o desenvolvimento da neoplasia. Com a constatação de que a infecção por HPV estava relacionada aos tumores de orofaringe, o esforço para compreender os mecanismos de carcinogênese do vírus, bem como sua interação com os demais fatores de risco para neoplasias de cabeça e pescoço, tem direcionado muitos estudos epidemiológicos e moleculares.

Todavia, as dificuldades de cultivo do HPV em sistemas celulares, a falta de modelos animais para o vírus e a dificuldade em encontrar modelos naturais para a infecção natural, impediram o entendimento da história natural da doença por muitos anos. Com o advento da clonagem molecular de genomas de HPV no início dos anos 1980 e a propagação viral em culturas organotípicas no final dos anos 1990, foi possível não apenas uma reclassificação taxonômica, mas também a proposição de modelos de infecção para o HPV (IARC, 2007).

As técnicas moleculares para detecção da infecção por HPV nas amostras avaliadas neste estudo se caracterizaram pela utilização de oligonucleotídeos

genéricos degenerados, que são complementares a uma região muito conservada do gene *L1* do HPV e, portanto, permitem a identificação de muitos tipos de HPV. Os produtos de PCR originados a partir dos iniciadores SB01/SB02 e MY11/MY09, com aproximadamente 450 pb, foram utilizados para padronização da técnica de detecção viral e obtenção do controle positivo por meio da clonagem molecular, à partir de biópsias de tecido fresco.

Todavia, como as amostras de CCECP eram de amostras incluídas em parafina, a proporção de material genético fragmentado obtida após as etapas de extração é bem maior, quando comparada àquela obtida a partir da extração de DNA de tecidos frescos. Ainda, como no processo de fixação das amostras avaliadas neste estudo foi utilizado o reagente fenol não tamponado, a possibilidade de maior degradação do material genético extraído era consideravelmente mais alta. Levando essas questões em consideração, optou-se pela utilização dos pares de oligonucleotídeos iniciadores GP5+/GP6+. Tais iniciadores amplificam uma região interna àquela amplificada pelos pares SB01/SB02 e MY11/MY09, com 150 pb sendo, portanto, mais adequada. Considerando também o estado de preservação de algumas amostras, que apresentaram menor quantidade de DNA extraído, foi utilizada a técnica de PCR *touchdown*, conforme descrito no item 4.2.4.3.3.

A prevalência da infecção por HPV encontrada neste estudo, de 24,6% (n=32), está de acordo com o encontrado por Soares et al. (2007) em um grupo de pacientes do Rio Grande do Norte (24%), mas acima do encontrado por Betiol (2016) em pacientes de São Paulo (SOARES et al., 2007; BETIOL, 2016). As médias mundiais são de 32% a 36%, mas podem ser bem menores, como apontam os achados na Índia (6%) (LUO et al., 2007). As variações nas estimativas de prevalência de HPV são grandes e têm sido relatadas em muitas publicações de séries de casos, com valores entre 4% a 75% (KOPPIKAR et al., 2005; DA SILVA et al., 2007; IARC, 2007; LUO et al., 2007; SOARES et al., 2007; LIANG et al., 2008; IARC, 2009).

Dados de um estudo do tipo caso-controle coletados da população do Caribe em 2017 mostraram uma prevalência de infecção por HPV de 36% para casos de CCECP, e 26% em controles (NAGHAVY et al., 2016; U.S CANCER STATISTICS WORKING GROUP, 2016; AUGUSTE et al., 2017). Os índices mundiais, todavia, refletem principalmente aqueles encontrados nos EUA, país com maior número de estudos publicados sobre o tema, e podem, portanto, não refletir a realidade de muitos países como o Brasil por exemplo, onde tais estudos estão iniciando e ainda não

possuem dados que permitam estabelecer uma média nacional, com muitas regiões sem qualquer dado sobre a relação HPV e CCECP.

Outro fator a ser considerado é que a comparação entre estudos de prevalência da infecção por HPV em CCECP é difícil, em função dos diferentes métodos de detecção utilizados. Mesmo em estudos onde apenas uma metodologia foi utilizada, a comparação ainda é um ponto crítico, uma vez que não há um padrão ouro. Neste estudo, foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores GP5+/GP6+, originado a partir de uma elongação nas extremidades 3' dos iniciadores GP5 e GP6, com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção de 10 a 100 vezes, permitindo a detecção de fentogramas de DNA viral para aqueles tipos com alta similaridade aos iniciadores (como o HPV-16), e de pictogramas para aqueles tipos de HPV com 4 ou mais bases não pareadas com um ou ambos os iniciadores (como os HPV-39 e HPV-1). Ao considerar também o uso da técnica de PCR *touchdown*, que aumenta a sensibilidade de detecção, as chances de falso-negativos são consideravelmente diminuídas (EVANS et al., 2005).

Os dados relacionados a distribuição por sexo e idade encontrados neste estudo não apresentaram diferenças em função da infecção por HPV, divergindo dos achados em outros países. Neste estudo, mais da metade dos casos HPV positivos (n=22) foi diagnosticada a partir da quinta década de vida, e 31,3% (n=10) foram de casos abaixo dos 50 anos de idade. Muitos estudos mostram como mais frequentes, os casos de CCECP HPV positivos em pacientes abaixo dos 50 anos de idade, e os casos HPV negativos mais frequentes a partir da quinta década de vida, principalmente após os 71 anos. Os dados deste estudo, porém, mostram que a maioria dos casos HPV negativos (78,6%) ocorreu a partir da quinta década de vida, o que pode ser consequência das características populacionais do estudo.

As variáveis cor da pele, estado civil, consumo de tabaco ou álcool, ou tabaco e álcool, também não apresentaram diferenças entre a população HPV positiva e a HPV negativa. Estudos recentes mostram, entretanto, que o consumo de tabaco aumenta significativamente as chances de desenvolvimento de infecção persistente por HPV, bem como dos CCECP HPV positivos, independentemente do comportamento sexual do indivíduo, o que reforça a necessidade de manutenção das campanhas de prevenção ao tabaco como estratégias de intervenção para os tumores de cabeça e pescoço, independente da presença do HPV (OSAZUWA-PETERS et al., 2017).

Em relação à escolaridade, foi encontrada uma associação entre escolaridade e o risco de infecção por HPV, sendo a baixa escolaridade um fator de proteção para a infecção por HPV. Este achado está em concordância com outros estudos, que trazem como provável explicação o fato de que indivíduos com maiores índices educacionais normalmente possuem um número maior de parceiros sexuais durante a vida, com hábitos sexuais de risco, aumentando assim, o risco de infecção por HPV (HECK et al., 2009; DAHLSTROM et al., 2015; WITTEKINDT et al., 2018).

Neste estudo, aproximadamente 60% dos casos HPV positivos (n=19) foram detectados em lábio e cavidade bucal, seguidos dos casos em laringe (25%, n=8), orofaringe (9,4%, n=3) e outros sítios anatômicos em cabeça e pescoço (6,3, n=2). Dados de uma revisão sistemática e meta-análise mostraram que distribuição da infecção por HPV por sítio anatômico foi de 24,2% em cavidade bucal, 45,8% em orofaringe e 22% em laringe, divergindo do encontrado neste estudo. Diferenças metodológicas, e possivelmente étnicas, entre os estudos, poderiam justificar os diferentes valores observados (NDIAYE et al., 2014).

Dos HPV que infectam humanos, mais de 100 tipos já foram identificados e sabe-se que aproximadamente a metade deles infecta o trato genital. Muitos tipos de HPV têm sido identificados nos tumores de colo de útero, enquanto outros são raramente ou nunca encontrados. Tumores de outras regiões anogenitais e de orofaringe têm sido recentemente associados à infecção por HPV, que também pode estar presente em tumores de pele de pacientes com epidermodisplasia verruciforme, tumores de pele do tipo não melanoma e ainda, na pele normal (IARC, 2007).

De acordo com a capacidade de promover a malignização da célula hospedeira, os HPV são agrupados como de baixo ou alto risco. Destes, os principais representantes são os HPV-16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. Entre os tipos de baixo risco oncogênico encontram-se os HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 (DE VILLIERS et al., 2004).

Os tipos mais prevalentes de HPV encontrados neste estudo podem foram o HPV-6 (75%, n=24), 11 (44%, n=14), 53 (9,4% n=3), 35 (9,4% n=3), 56 (6,3% n=2), 16 (6,3% n=2) e 45 (6,3% n=2).

A metodologia de genotipagem das amostras HPV positivas foi o sequenciamento do produto de PCR pelo método descrito por Sanger et al. (1977), seguido da análise da sequência obtida por programas específicos de análise de

sequências, conforme descrito no item 4.2.4.5. Neste método, após a amplificação por PCR, as amostras positivas são submetidas a outro ciclo de amplificação com o iniciador genérico GP5+ ou o GP6+, originando duas sequências complementares à região alvo. Quando há apenas um tipo de HPV na amostra analisada, uma sequência consenso é construída a partir das duas sequências obtidas e a análise filogenética é realizada seguindo padrões já estabelecidos. Essa sequência metodológica apresenta excelente concordância com outros métodos de genotipagem como a análise do tamanho do fragmento de restrição (RFLP), PCR tipo-específica para HPV e PCR quantitativa em tempo real (*real time qPCR*), hibridização reversa e outras.

Por outro lado, quando tal abordagem é utilizada para identificar os tipos de HPV presentes em infecções múltiplas, um cenário diferente se apresenta. Como o sequenciamento pelo método de Sanger com iniciadores genéricos produzirá cromatogramas mistos para infecções múltiplas, os mesmos deverão ser decompostos por programas de análise específicos, para que as sequências de DNA possam ser distinguidas.

Neste estudo, os cromatogramas obtidos foram submetidos à análise pela ferramenta *on-line Mixed Sequence Reader*, tendo sido obtidos resultados de múltiplas infecções por HPV com dois, três e até quatro tipos diferentes, como foi o encontrado em 24 das 32 amostras HPV positivas. Infecções múltiplas têm sido relatadas em casos de CCECP, e os dados encontrados neste estudo para tais infecções de 53,1% sendo em lábio e cavidade bucal, seguidos pelos casos em laringe, estão de acordo com os dados revisados sistematicamente na publicação de NDIAYE et al. (2014), que mostram as mesmas localizações anatômicas, e na mesma ordem, como as mais prevalentes para infecções múltiplas por HPV em CCECP, após avaliações de 148 estudos que contemplaram 12.163 casos de CCECP, publicados em 44 países.

Estudos que utilizam metodologias que detectam vários tipos de HPV, tanto de alto quanto de baixo risco em CCECP, têm mostrado a presença de tipos diferentes dos até então tidos como clássicos, como os HPV-16 e 18, com uma associação positiva tendo sido encontrada entre a infecção por HPV-6 e o risco para o desenvolvimento de CCECP, independente da utilização de tabaco e álcool (FURNISS et al., 2009). Ainda, a presença de outros tipos menos frequentes também tem sido mostrada, como a dos HPV-11, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 68, 69, 84 e

96, os quais também foram identificados neste estudo (NDIAYE et al., 2014). As diferentes metodologias de genotipagem utilizadas nos estudos poderiam explicar as variações entre os tipos de HPV encontrados, tendo sido inclusive, já documentadas na literatura (GUERRERO et al., 1992; TUCKER et al., 1993).

Tumores de cavidade bucal (língua, assoalho bucal, gengiva, palato e outros sítios bucais) têm uma associação com o consumo de tabaco e álcool bem documentada na literatura. Porém, existe uma proporção de tumores em cavidade bucal em indivíduos nunca expostos ao tabaco ou álcool, para os quais, as evidências apontam ser o HPV o principal fator desencadeador da doença (IARC, 2008). Atualmente, as evidências de carcinogênese são suficientes para relacionar o HPV-16 com esses tumores, e ainda limitadas para o HPV-18 (IARC, 2007). Isso deve-se, em sua maior parte, à dificuldade de análise e comparação entre os estudos em função das diferentes metodologias utilizadas. Ainda, a maior parte dos estudos suficientemente robustos e confiáveis, tanto em termos de número de casos, quanto em relação ao desenho metodológico e análise dos dados, utiliza uma metodologia de detecção específica apenas para alguns tipos de HPV de alto risco, o que poderia subestimar ou não detectar a presença de outros tipos de HPV.

Na meta-análise publicada por Ndiaye et al. (2014), os 6 tipos de HPV mais frequentes em CCECP, por sítio anatômico, foram os HPV-16, 18, 38, 6, 11 e 33 na cavidade bucal, os HPV-16, 33, 18, 6, 11 e 38 em orofaringe, e os HPV-16, 18, 6, 11, 33 e 38 em laringe, respectivamente. Foi também demonstrado que outros tipos de HPV estavam presentes CCECP, como os HPV de alto risco dos tipos 31, 35, 45, 52, 58, 68 e 96, o tipo de baixo risco 84, e os de provável alto risco 53, 56 e 69, todos detectados também neste estudo. Todavia, como a variação nos métodos de detecção utilizados é grande entre os estudos, com técnicas que detectam apenas um ou poucos tipos de HPV, análises mais aprofundadas são comprometidas.

O perfil epidemiológico das infecções por mais de um tipo de HPV não apresentou variação quando comparado ao de mono-infecções exceto para a variável cor da pele. Os resultados mostraram que indivíduos não brancos estariam mais protegidos da infecção por mais de um tipo de HPV. Todavia, conforme já mencionado, análises mais aprofundadas relacionadas à cor da pele são imprecisas, uma vez que os parâmetros de classificação não são uniformes entre os estudos, e neste estudo especificamente, pelo fato da coleta de dados ter sido retrospectiva, não houve a possibilidade de confirmação das informações obtidas do prontuário. Da

mesma forma, não houve variação entre os perfis epidemiológicos dos casos com infecção por 2 tipos de HPV, e os casos com mais de 2 tipos de HPV detectados.

Em relação aos diferentes gêneros de HPV encontrados neste estudo, observou-se que a maioria das infecções foi por HPV do gênero *alpha*, *beta* e *gamma*, respectivamente. Ainda, o fato de que lábio e cavidade bucal foram os únicos sítios com infecções por HPV do gênero *gamma*, sendo este gênero observado apenas nas lesões com estadiamento T3 e T4, e em casos bem ou moderadamente diferenciados, poderia ter alguma correlação com o início da doença e desfecho clínico, uma vez que não foram encontrados HPV do gênero *beta* entre aqueles que sobreviveram.

Alguns estudos já têm demonstrado a presença dos gêneros *beta* e *gamma* na cavidade bucal, especulando qual seria a participação dos mesmos no desenvolvimento dos CCECP (GARBUGLIA, 2014). Agalliu et al. (2016) demonstraram que, embora a detecção de HPV-16 preceda a incidência de CCE de orofaringe, associações com outros tipos de HPV, especificamente das espécies *gama* 11 e 12 e o HPV-5 da espécie *beta* 1, sugerem um papel muito mais amplo na etiologia dos CCECP relacionados ao HPV, na população por eles estudada. Ainda no mesmo estudo foram detectados os HPV de alto risco 31, 33, 45, 52 e 58, os HPV de baixo risco 6, 42 e 54, além do HPV-53 (classificado como provável alto risco), todos também identificados neste estudo.

Estudos que avaliaram a soroprevalência dos HPV-6, 11, 16 e 18 e o risco para CCECP mostraram que a soropositividade para o HPV-16 está relacionada com maior risco de CCECP, sendo este risco ainda maior para os CCE de faringe (GILLISON et al., 2000; HERRERO et al., 2003; D'SOUZA et al., 2007a; FURNISS et al., 2007). Todavia, os autores relatam surpresas os achados de que o risco para CCE de cavidade bucal e faringe estava também associado com a soropositividade para o HPV-6, independente do HPV-16, sugerindo que talvez o HPV-6 pudesse agir por meio de um mecanismo de “bater e correr” (do inglês “*hit and run*”). Isso poderia explicar a ausência de detecção de infecção por HPV-6 nos CCECP demonstrada na maioria dos estudos que utiliza apenas metodologias para detecção do DNA viral.

Embora este estudo não tenha dados referentes a soropositividade, a alta prevalência de HPV-6 (75%) encontrada e o fato de o mesmo estar presente em todos os casos de infecção múltipla, poderiam sugerir que, em algum momento, a sua presença possa ter desencadeado mecanismos facilitadores para o início ou progressão do tumor, ou ambos, uma vez que já existe evidência de progressão

maligna em alguns casos de papilomatose respiratória, uma doença com lesão benigna associada ao HPV-6, principalmente quando quadros de longa duração da doença, radioterapia e exposição ao tabaco estão presentes (HERRERO, 2003; EL ASHKAR et al., 2018).

Outro estudo que avaliou a soropositividade para HPV em casos de CCECP negativos para HPV-16 (avaliados por PCR seguida de “*probe-array*”) mostrou sorologia positiva para os HPV-18, 31 e 35 em 20%, 14% e 22% dos casos HPV negativos, respectivamente (GILLISON et al., 2008). Tais achados poderiam reforçar a hipótese da participação de mais um tipo de HPV no desenvolvimento dos CCECP.

Este estudo apresenta limitações como a ausência de um grupo controle e o uso de apenas uma metodologia para detecção da infecção por HPV. Ainda, o fato da busca de dados ter sido realizada em prontuários não permitiu acessar variáveis importantes como a presença de lesões cancerizáveis prévias ao desenvolvimento da neoplasia, o histórico familiar de neoplasias de cabeça e pescoço, os hábitos sexuais, a presença de lesões genitais por HPV, entre outras. O fato de o estudo ser retrospectivo também impossibilitou as avaliações relacionadas à qualidade de vida e sobrevida total e específica.

A proporção de tumores de cavidade bucal e faringe associada a infecção por HPV varia muito entre os estudos, dependendo da acurácia na diferenciação entre os casos de orofaringe e tonsilas com outros sub-sítios na cavidade bucal, o efeito competitivo do tabaco, e a qualidade das biópsias e protocolos de detecção do HPV. Ainda, estudos prospectivos com a população brasileira, que utilizem mais de uma metodologia para a detecção do HPV ajudarão a compreender a distribuição e possível relação dos diferentes tipos de HPV nos CCECP, auxiliando no estabelecimento de um possível perfil de mono-infecção ou infecção múltipla, e sua relação com as demais variáveis relacionadas.

7 CONCLUSÕES

- A frequência de infecção pelo HPV em CCECP foi de 24,6%, estando acima do encontrado em estudos com outras populações brasileiras, mas de acordo com a média encontrada em relatos de meta-análise.
- A genotipagem de HPV foi padronizada segundo o protocolo de sequenciamento do tipo Sanger e análise das sequências nucleotídica obtidas.
- Os segmentos obtidos foram comparados com sequências de referência para análise genotípica do HPV, por meio da ferramenta *on line Mixed Sequence Reader*, tendo sido identificados 30 tipos de HPV de 3 gêneros distintos e 24 casos de infecção múltipla.
- A população estudada era composta majoritariamente de homens brancos, com mediana de idade de 60 anos, apresentando elevado consumo de tabaco e álcool, que apresentaram a maioria dos tumores bem ou moderadamente diferenciados, em estadiamento T3 e T4.
- As características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes infectados com os diferentes genótipos de HPV foi semelhante àquelas encontradas para os pacientes HPV negativos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação do HPV ao desenvolvimento de lesões malignas em cabeça e pescoço, bem como a observação de que tais casos apresentam melhor resposta ao tratamento e sobrevida, evidenciam a problemática da necessidade de mais estudos não apenas para melhor entendimento dos mecanismos moleculares, viral e celulares, envolvidos no processo de malignização, mas também para que, com o conhecimento da história natural da doença em CCECP, medidas eficazes de prevenção sejam estabelecidas. Até o momento, todavia, já são claras as evidências que apontam para a necessidade de desconstruir o paradigma de que a infecção por HPV se trata apenas de uma “doença sexualmente transmissível”. A conscientização de que é uma infecção “que pode causar câncer” pode ter impactos profundos não apenas na adesão às campanhas de vacinação, mas eventualmente, no estilo e hábitos de vida de uma população.

Os dados deste estudo mostraram uma realidade, infelizmente, presente em grande parte da população brasileira. Diagnóstico tardio e baixa escolaridade refletem diretamente não apenas a problemática social atual do Brasil, mas também a necessidade de formação e capacitação de profissionais para o diagnóstico e encaminhamento precoces.

Por fim cabe destacar que a presente pesquisa é o primeiro estudo a investigar a infecção por HPV em CCECP nesta região do país, analisando epidemiologicamente as características desta população. Além disso, o estudo possibilitou a padronização da detecção genética do HPV em material incluído em parafina, assim como a aplicação de ferramentas de análise filogenética que permitiu evidenciar a alta frequência de infecções múltiplas concomitantes. Tais achados poderão contribuir para a ampliação deste estudo, por meio da inclusão desta metodologia de forma rotineira nos serviços de referência para estes pacientes.

REFERÊNCIAS

- AGALLIU, I.; GAPSTUR, S.; CHEN, Z.; WANG, T.; ANDERSON, R. L.; TERAS, L. et al. Associations of Oral α -, β -, and γ -Human Papillomavirus Types With Risk of Incident Head and Neck Cancer. **JAMA Oncology**, v. 1, p. 599-606, 2016.
- AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; CARNEIRO, S. M.; VILLA, L. L.; BOCCARDO, E.; PÉREZ-MARTINEZ, G.; PEREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M. L. S.; HO, P. L. Production of Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles by Recombinant *Lactobacillus casei* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 745-752, 2006.
- ALVARENGA, L. M.; RUIZ, M. T.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; RUBACK, J. C.; MANIGLIA V.; GOLONI-BERTOLLO, E. M. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.74, p. 68-73, 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2017**. Atlanta, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>>.
- ANANTHARAMAN, D.; BILLOT, A.; WATERBOER, T.; et al. Predictors of oropharyngeal cancer survival in Europe. **Oral Oncology**, v. 81, n. April, p. 89–94, 2018.
- ANDREOTTI, M.; RODRIGUES, A. N.; CARDOSO, L. M. N.; FIGUEIREDO, R. A. O.; ELUF-NETO, J.; WÜNSCH-FILHO, V. Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 543-552, 2006.
- ANG, K. K.; HARRIS, J.; WHEELER, R.; WEBER, R.; ROSENTHAL, D. I.; NGUYEN-TÂN, P. F.; et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 24-35, 2010.
- ANTUNES, J. L. F.; BIAZEVIC, M. G. H.; DE ARAUJO, M. E.; TOMITA, N. E.; CHINELLATO, L. E. M.; NARVAI, P. C. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. **Oral Oncology**, v. 37, p. 345–350, 2001.
- APPLEBAUM, K. M.; FURNISS, C. S.; ZEKA, A.; POSNER, M. R.; SMITH, J. F.; BRYAN, J. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, p. 1801-1810, 2007.

- BAUER, H. M.; MANOS, M. M. **PCR detection of genital human papillomavirus.** In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, J. T. (Editors). Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. p. 407-413.
- BAXI, S. S.; PINHEIRO, L. C.; PATIL, S. M.; PFISTER, D. G. Causes of Death in Long-Term Survivors of Head and Neck. **Cancer**, v. 120, p. 1507–1513, 2014.
- BEGUM, S.; CAO, D.; GILLISON, M.; ZAHURAK, M.; WESTRA, W. H. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 5694–5699, 2005.
- BELL, D. A.; TAYLOR, J. A.; PAULSON, D. F.; ROBERTSON, C. N.; MOHLER, J. L.; LUCIER, G. W. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, p. 1159-1164, 1993.
- BERMAN, T. A.; SCHILLER, J. T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. **Cancer**, v. 123, p. 2219–2229, 2017.
- BERGLUND, B. A.; BORING, D. L.; HOWLETT, A. C. Investigation of structural analogs of prostaglandin amides for binding to and activation of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in rat brain and human tonsils. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, v. 469, p. 527–533, 1999.
- BETIOL, J. C.; SICHERO, L.; COSTA, H. O. D. O.; DE MATOS, L. L.; ANDREOLI, M. A.; FERRERIRA, S. et al. Prevalence of human papillomavirus types and variants and p16 INK4a expression in head and neck squamous cells carcinomas in São Paulo, Brazil. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, p. 1–7, 2016.
- BOSCH, F. X.; QIAO, Y.; CASTELLSAGUÉ, X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal Of Gynecological Obstetrical And Reproductive Medicine Research* , v. 94, p. 8–21, 2006.
- BOUSARGHIN, L.; TOUZÉ, A.; SIZARET, P.-Y. Y.; COURSAGET, P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. **Journal of virology**, v. 77, n. 6, p. 3846-50, 2003.
- BRANDIZZI, D.; GANDOLFO, M.; VELAZCO, M. L.; CABRINI, R. L.; LANFRANCHI, H. E. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 13, p. 544–548, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos** / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

BRAY, F.; REN, J.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 132, p. 1133-1145, 2012.

BRAY, F.; FERLAY J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394-424, 2018.

BRENNAN, J. A.; BOYLE, J. O.; KOCH, W. M.; GOODMAN, S. N.; HRUBAN, R. H.; YOLANDA, J. E. et al. 1995. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 712–717, 1995.

BROOKS, P. J.; THERUVATHU, J. A. DNA adducts from acetaldehyde: Implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol**, v. 35, p. 187–193, 2005.

BRUMBAUGH, K. M.; OTTERNESS, D. M.; GEISEN, C.; OLIVEIRA, V.; BROGNARD, J.; LI, X. et al. The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. **Molecular Cell**, v. 14, p. 585–598, 2004.

CAMPO, M. S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in microbiology**, v. 3, n. 3, p. 92-7, 1995.

CARVALHO, A.; NISHIMOTO, I.; CALIFANO, J.; KOWALSKI, L. P. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 806-816, 2005.

CASATI, M.; VASCONCELOS, J. A.; VERGNHANINI, G. S.; CONTREIRO, P. F.; GRAÇA, T. B.; KANDA, J. L. et al. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 41, p. 186–191, 2012.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, p. S4-7, 2008. Supplement 2.

CHANG, C. T.; TSAI, C. N.; TANG, C. Y.; CHEN, C. H.; LIAN, J. H.; HU, C. H. et al. Mixed sequence reader: A program for analyzing DNA sequences with heterozygous base calling. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; ANDERSON, W. F.; GILLISON, M. L. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, p. 612-619, 2008.

CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; TERVAHAUTA, A.; SYRJÄNEN, K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. **British Journal of Cancer**, v. 68, p. 653–661, 1993.

CMELAK, J. Current issues in combined modality therapy in locally advanced head and neck cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 84, p. 261-273, 2012.

CONWAY, M. J.; MEYERS, C. Replication and assembly of human papillomaviruses. **Journal of Dental Research**, v. 88, p. 307–317, 2009.

COSER, J.; BOEIRA, T. DA R.; KAZANTZI FONSECA, A. S.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R. Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 467–472, 2011.

CULLEN, A. P.; REID, R.; CAMPION, M.; LÖRINCZ, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **Journal of virology**, v. 65, p. 606–612, 1991.

DAHLSTROM, K. R.; BELL, D.; HANBY, D.; LI, G.; WANG, LI. E.; WEI, Q.; WILLIAMS, M. D. et al. Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. **Oral Oncology**, v. 51, n. 9, p. 832–838, 2015.

DAS, L. C.; KARRISON, T. G.; WITT, M. E.; MULLER, C.; BLAIR, E. A.; COHEN, E. E. W. et al. Comparison of outcomes of locoregionally advanced oropharyngeal and non-oropharyngeal squamous cell carcinoma over two decades. **Annals of Oncology**, v. 26, p. 198–205, 2015.

DA SILVA, C. E. X. S.R.; DA SILVA, I. D. C. G.; WECKX, L. L M. Prevalence oh human papillomavirus in squamous cell carcinome of the tongue. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 104, p. 497-500, 2007.

DAY, P.; LOWY, D.; SCHILLER, J. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. **Virology**, v. 307, n. 1, 2003.

DAY, P. M.; BAKER, C. C.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p. 14252-7, 2004.

DE CAMPOS, Karla Lopes Mandu. **Eficiência dos métodos de coleta clínica e autocoleta, de células cervicais e vaginais, para detecção do DNA de papilomavírus humano**. Campo Grande, 2013. 62f. Dissertação (mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

DE FREITAS, A. C.; OLIVEIRA, T. H. A.; BARROS JR, M. R.; VENUTI, A. hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, p. 1-15, 2017.

DENOIX, P.F. **Bulletin. Institut national d'hygiène (France)**. 944;1:69. 1944;2:82. 1950;5:81. 1952; 7:743.

DE VILLIERS, E. M. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.-U. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DELL, G.; WILKINSON, K. W.; TRANTER, R.; et al. Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. **Journal of molecular biology**, v. 334, n. 5, p. 979-91, 2003.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, p. 525–541, 2006.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, p. 80–98, 2013.

D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W. M. et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 1944–1956, 2007a.

D'SOUZA, G.; FAKHRY, C.; SUGAR, E. A.; SEABER, E. C.; WEBER, K.; MINKFF, H. L. et al. Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 143–150, 2007b.

EL-ACHKAR, V. N. R.; DUARTE, A.; SAGGIORO, F. P.; MELLO FILHO, F. V.; LEÓN, J. E.; RIBEIRO-SILVA, A. et al. Squamous Cell Carcinoma Originating from Adult Laryngeal Papillomatosis: Case Report and Review of the Literature. **Case Reports in Otolaryngology**, v. 2018, p. 1–5, 2018.

ESMO - European Society for Medical Oncology. ECONOMOPOULOU, P.; PSYRRI, A. Epidemiology, risk factors and pathogenesis of squamous cell tumours. Cap. 1. In: **Head & Neck Cancers: Essentials for Clinicians**. LICITRA, L.; KARAMOUZIS, M. V. (Editors). London, U. K.: European Society for Medical Oncology; 2017. p. 1-6.

EVANS, M. F.; ADAMSON, C. S. C.; SIMMONS-ARNOLD, L.; COOPER, K. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. **BMC Clinical Pathology**, v. 5, p. 1–14, 2005.

FAKHRY, C.; WESTRA, W. H.; LI, S.; CMELAK, A.; RIDGE, J. A.; PINTO, H. et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, p. 261–269, 2008.

FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M. et al. (2018). **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, p. 1941–1953, 2019.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201–5207, 2003.

FISHER, R. A. (1970). **Statistical methods for research workers**. 14. ed. Edinburgh: Oliver and Boyd. 1970. 362 p.

FRAZIER, L. Genital warts in children. **The American Professional Society of the Abuse of Children Advisor**, v. 11, p. 9–12, 1998.

FURNISS, C. S.; MCCLEAN, M. D.; SMITH, J. F.; BRYAN, J.; APPLEBAUM, K. M.; NELSON, H. H. et al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 120, p. 2386–2392, 2007.

FURNISS, C. S.; MCCLEAN, M. D.; SMITH, J. F.; BRYAN, J.; NELSON, H. H.; PETERS, E. S. et al. Human papillomavirus 6 seropositivity is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol use. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 20, p. 534-541, 2009.

GARBUGLIA, A. R. Human papillomavirus in head and neck cancer. **Cancers**, v. 18, p. 1705-1726, 2014.

GATTA, G.; BOTTA, L.; SÁNCHEZ, M. J.; ANDEERSON, L. A.; PIERANNUNZIO, D.; LICITRA, L. et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. **European Journal of Cancer**, v. 51, p. 2130–2143, 2015.

GILLISON, M. L.; KOCH, W. M.; CAPONE, R. B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W. H.; WU, L. et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 709-720, 2000.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUN, S. et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, p. 407-420, 2008.

GILLISON, M. L.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R. K. L.; TONG, Z.; XIAO, W.; KAHLE, L. et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. **Jama**, v. 307, p. 693, 2012a.

GILLISON, M. L.; ALEMANY, L.; SNIJDERS, P. J. F.; CHATUVERDI, A.; STEINBERG, B. M.; SCHWARTZ, S. et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: Head and neck cancer and respiratory papillomatosis. **Vaccine**, v. 30, p. F34–F54, 2012b.

GILLISON, M. L.; CASTELLSAGUÉ, X.; CHATURVEDI, A.; GOODMAN, M. T.; SNIJDERS, P.; TOMMASINO, M. et al. Eurogin Roadmap: Comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. **International Journal of Cancer**, v. 134, p. 497–507, 2013.

GILLISON, M. L.; CHATURVEDI, A. K.; ANDERSON, W. F.; FAKHRY, C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, p. 3235–3242, 2015.

GRAPHPAD PRISM version 8.2.1 for Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, California USA, 2019, www.graphpad.com.

GUERRERO, E.; DANIEL, R. W.; BOSCH, F. X.; CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N.; GILI, M. et al. Comparison of ViraPap, southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2951–2959, 1992.

GONZALEZ, M. V.; PELLO, M. F.; LOPEZ-LARREA, C.; SUAREZ, C.; MENENDEZ, M. J.; COTO, E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clinical Cancer Research**, v.1, p. 1043–1049, 1995.

GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. **Viruses**, v. 9, p. 1–10, 2017.

GUINDON S., DUFAYARD J.F., LEFORT V., ANISIMOVA M., HORDIJK W., GASCUEL O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-21, 2010.

HECK, J. E.; BERTHILLER, J.; VACCARELLA, S.; WINN, D. M.; SMITH, E. M.; SHAN'GINA, O. et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: A pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, p. 166–181, 2009.

HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA, M.; LISSOWSKA, J.; KEE, F.; BALARAM, P. ET AL. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 95, p. 1772–1783, 2003.

HERRERO R. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 31, p. 47–51, 2003.

HO, T.; WEI, Q.; STURGIS, E. M. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck**, v. 29, p. 682–699, 2007.

HOWLADER, N., NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; MILLER, D.; BISHOP, K.; KOSARY, C. L. et al. **SEER cancer statistics review**, 1975–2010, vol. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2013. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011>.

HUANG, S. H.; MRT, T.; SULLIVAN, B. O. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. **Current Treatment Options In Oncology**, v. 18, p.40, 2017.

HUDELIST, G.; MANAVI, M.; PISCHINGER, K. I. D.; WATKINS-RIEDEL, T.; SINGER, C. F.; KUBISTA, E. et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: Different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p. 873–880, 2004.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Human Papillomaviruses / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans** (2005 : Lyon, France), 2007, v. 90, 689 p.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **A review of human carcinogens. Part B: Biological agents / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 2009: Lyon, France., 2009.

INCA - Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva, Brasil. **Monitoramento das Ações de Controle dos Cânceres de Lábio e Cavidade Oral. Informativo Detecção Precoce, ano 7, n. 1, 2016**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/informativodeteccaoprecoce_janabr2016.pdf>.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, Brasil. **Dados da Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information**. Bethesda, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_046672.1?report=genbank&from=5123&to=5160>. Acesso em 10 dez. 2019.

JACOBS, M. V.; DE RODA HUSMAN, A. M.; VAN DEN BRULE, A. J.; et al. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 4, p. 901-5, 1995.

JOYCE, J. G.; TUNG, J. S.; PRZYSIECKI, C. T.; COOK, J. C.; DALE LEHMAN, E.; SANDS J. A. et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, p. 5810-5822, 1999.

KERO, K.; RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, K.; GRENNAN, S.; SYRJÄNEN, S. Oral mucosa as a reservoir of human papillomavirus: point prevalence, genotype distribution, and incident infections among males in a 7-year prospective study. **European Urology**, v. 62, p. 1063-1070, 2012.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 12180–12184, 1992.

KOPPIKAR, P.; DE VILLIERS, E. M.; MULHERKAR, R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. **International Journal of Cancer**, v. 113, p. 946–950, 2005.

KOSKELA, P.; ANTTILA, T.; BJØRGE, T.; BRUNSVIG, A.; DILLNER, J.; HAKAMA, M. et al. *Chlamydia Trachomatis* Infection As A Risk Factor For Invasive Cervical Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 85, p. 5–39, 2000.

LIANG, X. H.; LEWIS, J.; FOOTE, R.; SMITH, D.; KADEMANI, D. Prevalence and Significance of Human Papillomavirus in Oral Tongue Cancer: The Mayo Clinic Experience. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, p. 1875–1880, 2008.

LIU, X.; CLEMENTS, A.; ZHAO, K.; MARMORSTEIN, R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, p. 578-586, 2006.

LUO, C. W.; ROAN, C. H.; LIU, C. J. Human papillomaviruses in oral squamous cell carcinoma and pre-cancerous lesions detected by PCR-based gene-chip array. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, p. 153–158, 2007.

MACHIELS, J. P. H.; HADDAD, R. I.; FAYETTE, J.; LICITRA, L. F.; TAHARA, M.; VERMORKEN, J. B. et al. Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): An open-label, randomised phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 16, p. 583–594, 2015.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, p.121:231–41, 2003.

MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 18, p. 50-60, 1947.

MAYNE, S. T.; CARTMEL, B.; KIRSH, V.; GOODWIN, JR. W. J. Alcohol and tobacco use prediagnosis and postdiagnosis, and survival in a cohort of patients with early stage cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, p. 3368-3374, 2009.

MICROSOFT CORPORATION. Microsoft Excel [Internet]. 2018. Disponível em: <<https://office.microsoft.com/excel>>.

MCKALLIP, R. J.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Delta-9-Tetrahydrocannabinol Enhances Breast Cancer Growth and Metastasis by Suppression of the Antitumor Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 3281–3289, 2005.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 550–560, 2010.

MOORE, K. A.; MEHTA, V. The Growing Epidemic of HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Clinical Review for Primary Care Providers. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 28, p. 498-503, 2015.

MORGAN, I. M.; DINARDO, L. J.; WINDLE, B. Integration of human papillomavirus genomes in head and neck cancer: Is it time to consider a paradigm shift? **Viruses**, v. 9, p. 1-16, 2017.

MOSCICKI, A. B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.; VILLA, L. L. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, p. 42–51, 2006.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. 1–10, 2006.

MROZ, E. A.; ROCCO, J. W. MATH, a novel measure of intratumor genetic heterogeneity, is high in poor-outcome classes of head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 49, p. 211–215, 2013.

NAGHAVI, A. O.; ECHEVARRIA, M. I.; STROM, T. J.; ABUODEH, Y. A.; AHMED, K. A.; VENKAT, P. S. et al. Treatment delays, race, and outcomes in head and neck cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 45, p. 18-25, 2016.

NARDELLI-HAEFLIGER, D.; RODEN, R. B. S.; BENYACOU, J.; SAHLI, R.; KRAEHEMBUHL, J. P.; SCHILLER, J. T. et al. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and

systemic neutralizing antibodies in mice. *Infection and Immunity* v. 65, p. 3328-3336, 1997.

NDIAYE, C.; MENA, M.; ALEMANY, L.; et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16 INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Oncology**, v. 15, p. 1319-1331, 2014.

NULTON, T. J.; OLEX, A. L.; DOZMOROV, M.; MORGAN, I. M.; WINDLE, B. Analysis of the cancer genome atlas sequencing data reveals novel properties of the human papillomavirus 16 genome in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, p. 17684–17699, 2017.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 385-392, 2006.

OSAZUWA-PETERS, N.; SIMPSON, M. C.; MASSA, S. T.; BOAKYE, E. A.; ANTISDEL, J. L.; VARVARES, M. 40-year incidence trends for oropharyngeal squamous cell carcinoma in the United States. **Oral Oncology**, v. 74, n. September, p. 90–97, 2017.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annual Review of Pathology**, v. 4, p. 49-70, 2009.

PATTERSON, N. A.; SMITH, J. L.; OZBUN, M. A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 79, p. 6838-47, 2005.

PEREIRA, D.; ANTONI, M.; DANIELSON, A.; et al. Life Stress and Cervical Squamous Intraepithelial Lesions in Women With Human Papillomavirus and Human Immunodeficiency Virus. **Psychosomatic Medicine**, v. 65, n. 3, p. 427, 2003.

PINTO, F. R.; MATOS, L. L.; GUMZ SEGUNDO, W.; VANNI, C. M. R. S.; ROSA, D. S.; KAN DA J. L. Tobacco and alcohol use after head and neck cancer treatment: influence of the type of oncological treatment employed. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, p. 171-176, 2011.

POETA, M. L.; MANOLA, J.; GOLDWASSER, M. A.; FORASTIERE, A.; BENOIT, N.; CALIFANO, J. A. et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 2552–2561, 2007.

RAGIN, C. C. R.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 1813–1820, 2007.

RAMBAUT, A. 2014. FigTree, ver. 1.4.2. [Online]. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>.

REZENDE, C. P.; RAMOS, M. B.; DAGUÍLA, C. H.; DEDIVITIS, R. A.; RAPOPORT, A. Alterações da saúde bucal em portadores de câncer da boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, p. 596-600, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Biotechnology**, v. 24, p.104-108, 1977.

SARAIVA, N.; GENTIL, F.; RODRIGUES, J.; BONITO, N.; PRAZERES, H.; CRUZ, E. et al. The role of human papillomavirus in head and neck tumors. **Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial**, v. 54, p. 227–231, 2016.

SEOANE-ROMERO, J. M.; VÁZQUEZ-MAHÍA, I.; SEOANE, J.; VARELA-CENTELLES, P.; TOMÁS, I.; LÓPEZ-CEDRUN, J. L. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, p. 35-40, 2012.

SCUDELLARI, M. Sex, Cancer and a Virus. **Nature**, v. 503, p. 330-332, 2013.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2019**. CA: Cancer Journal for Clinicians, v. 69, p. 7-34, 2019.

SHAFTI-KERAMAT, S.; HANDISURYA, A.; KRIEHLUBER, E. et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 77, p. 13125-13135, 2003.

SHEN, W.; SAKAMOTO, N.; YANG, L. Cancer-Specific Mortality and Competing Mortality in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma : A Competing Risk Analysis. **Annals Of Surgical Oncology**, v. 22, p. 264–271, 2015.

SCHLECHT, N. F.; FRANCO, E. L.; PINTOS, J.; KOWALSKI, L. P. Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. **Epidemiology**, v. 10, p. 412–418, 1999.

SMITH, E.; HOFFMAN, H.; SUMMERGILL, K.; KIRCHNER, H. L.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. Human papilloma virus and risk of oral cancer. **The Laryngoscope**, v. 108, p. 1098-1103, 1998.

SOARES, R. C.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, B.; COSTA, A. L.; MEDEIROS, S. R.; PINTO, L. P. Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. **American Journal of Otolaryngology**, v. 28, p. 397–400, 2007.

SOAVE, D. F.; CELES, M. R. N. C.; OLIVEIRA-COSTA, J. P.; SILVEIRA, G. G.; ZANETTI, B. R.; OLIVEIRA, L. R. et al. **The Role of Human Papillomavirus in Pre-Cancerous Lesions and Oral Cancers**. In: Human Papillomavirus and Related Diseases – From Bench to Bedside. A Diagnostic and Preventive Perspective. BROECK, D. V. (Editor). Bélgica: 2013. p. 241-267.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 155-160, 2005.

ST GUILY, J. L.; CLAVEL, C.; OKAÏS, C.; PRÉTE, J. L.; BEBY-DEFAUX, A.; AGIUS, G. et al. Human papilloma virus genotype distribution in tonsil cancers. **Head & neck oncology**, v. 3, p. 6, 2011.

STANLEY, M. A.; PETT, M. R. COLEMAN N. HPV: from infection to cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1456–1460, 2007.

STURGIS, E. M.; WEI, Q.; SPITZ, M. R. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. **Seminars in Oncology**, v. 31, p. 726–733, 2004.

TALAMINI, R.; BOSETTI, C.; LA VECCHIA, C.; DAL MASO L.; LEVI, F.; BIDOLI, E. et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: A case-control study. **Cancer Causes and Control**, v. 13, p. 957–964, 2002.

TAMURA K, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**. v.30, p. 2725-2729, 2013.

THOMAS, M.; DAVID, P.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene**, v. 18, p. 7690–7700, 1999.

THOMAS, M.; NARAYAN, N.; PIM, D.; TOMAIĆ, V.; MASSIMI, P.; NAGASAKA, K. et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. **Oncogene**, v. 27, p. 7018-1030, 2008.

TUCKER, R. A.; JOHNSON, P. R.; REEVES, W. C.; ICENOGLE, J. P. Virological Methods Using the polymerase chain reaction to genotype human papillomavirus DNAs in samples containing multiple HPVs may produce inaccurate results. **Journal of Virological Methods**, v. 43, p. 321–334, 1993.

UICC - International Union Against Cancer (UICC): **TNM Classification of malignant tumours**. Geneva, 1968. 281 p.

U.S. Cancer Statistics Working Group, United States Cancer Statistics: **1999–2013 Incidence and Mortality Web-based Report**, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute, Atlanta: U.S, 2016.

UZCUDUN, A. E; RETOLAZA, I. R; GRANDE, A. G; et al. Pharyngeal cancer prevention: Evidence from a case-control study involving 232 consecutive patients. **Journal of Laryngology and Otology**, v. 116, n. 7, p. 523–531, 2002.

VAN DOORSLAER, K. et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 571–578, 2013.

VAN DOORSLAER, K.; MCBRIDE, A. A. Molecular archeological evidence in support of the repeated loss of a papillomavirus gene. **Nature Scientific Reports**, v. 6, p. 1-8, 2016.

VLADIMIROV, B. S.; SCHIODT, M. The effect of quitting smoking on the risk of unfavorable events after surgical treatment of oral potentially malignant lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 38, p. 1188–1193, 2009.

WASYLYK, B.; ABECASSIS, J.; JUNG, A. C. Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: In p16 should we trust? **Oral Oncology**, v. 49, p. 33-37, 2013.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; c2002. 180 p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and cancers of the mouth, pharynx and larynx**. Disponível em: dietandcancerreport.org.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Health and Social Effects of Nonmedical Cannabis Use**. HALL, W.; RENSTRÖM, M.; POZNYAK V. (Editors). Geneva: World Health Organization; 2016. 62 p.

WITTEKINDT, C.; WAGNER, S.; SHARMA, S. J.; WÜNDERMANN, N.; KNUTH, J.; HEDER, H. et al. HPV - A different view on Head and Neck Cancer. **Laryngo-rhinotologie**, v. 97, p. S48–S113, 2018.

WOODS, R.; O'REGAN, E. M.; KENNEDY, S.; MARTIN, C.; O'LEARY, J.; TIMON, C. Role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A review. **World journal of clinical cases**, v. 2, p. 172-93, 2014.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 7, p. 11–22, 2007.

WORSHAM, M. J.; STEPHEN, J. K.; LU, M.; CHEN, K. M.; HAVARD, S.; SHAH, V. et al., Disparate molecular, histopathology, and clinical factors in head and neck squamous cell carcinoma racial groups, **Otolaryngology-Head And Neck Surgery: Official Journal Of American Academy Of Otolaryngology-Head And Neck Surgery**, v. 147, p. 281–288, 2013.

XIE, X.; PIAO, L.; BULLOCK, B. N.; SMITH, A.; SU, T.; ZHANG, M. et al. Targeting HPV16 E6-p300 interaction reactivates p53 and inhibits the tumorigenicity of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 33, p. 1037–1046, 2014.

YANG, L.; MOHR, I.; FOUTS, E.; LIM, D. A.; NOHAILE, M.; BOTCHAN, M. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 5086–5090, 1993.

ZANDBERG, D. P.; LIU, S.; GOLOUBEVA, O.; ORD, R.; STROME, S. E.; SUNTHARALINGAM, M. et al. Oropharyngeal cancer as a driver of racial outcome disparities in squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year experience at the University of Maryland Greenebaum Cancer Center. *Head and Neck*, v. 38, p. 564–572, 2016.

ZHANG, P.; NOURI, M.; BRANDSMA, J.; et al. Induction of E6/E7 Expression in Cottontail Rabbit Papillomavirus Latency Following UV Activation. **Virology**, v. 263, n. 2, 1999.

ZHU, L. X.; SHARMA, S.; STOLINA, M.; GARDNER, B.; ROTH, M. D. TASHKIN, D. P. et al. 2000. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 373–380, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, p. 260-265, 2009.

ANEXO 1 – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS (HPV) DETECTADOS EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO - QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA

1. Número do participante Data da entrevista: - -

Nome do paciente: Telefone:

Endereço:

Nº do registro médico ou prontuário: A2 Iniciais (sobrenome-nome)

A3 Hospital: A4 Departamento:..... (1) Clínica médica (2) Cirurgia (3) Gin/Obstetrícia

(4) Ortopedia (5) Otorrinol. (6) Dermatologia (7) Oftalmologia (8) Odontologia (9) Radioterapia (10) Oncologia

(11) TMO (12) Peroral (13) Estomatologia (14) Ambulatório (15) Outro (especificar):

A5 Diagnóstico principal da baixa hospitalar - (para pacientes ambulatoriais apenas com suspeita de câncer = 8888). (CID 10)

A6 Data de admissão hospitalar (ou consulta) - - A7 Entrevistador:

Bom dia Sr. (a) Meu nome é

Nós estamos realizando um estudo para saber se certos hábitos das pessoas estão relacionados com algumas doenças. Vou lhe fazer algumas perguntas e anotar as respostas neste questionário. Tudo que for dito será confidencial. Se o (a) Sr. (a) não entender qualquer uma das questões, peça para eu lhe explicar. Podemos começar? Será que o (a) Sr. (a) poderia assinar essa folha de consentimento?

INFORMAÇÕES GERAIS - B1 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

B2 Qual é a sua idade (anos completos)..... B3 Data de nascimento - -

B3a Raça

(1) Branco (2) Mulato (3) Negro (4) Índio (5) Oriental

B4 Em que cidade o (a) Sr. (a) nasceu?

B5 O (a) Sr. (a) frequentou a escola? (1) sim (2) não Se **não** vá para C1 B6 Até que grau o (a) Sr. (a) estudou? _____ grau

HÁBITO DE FUMAR Se **nunca fumou**, vá para C5

C1 O (a) Sr. (a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro ou charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano? Se **parou nos últimos 12 meses**, assinalar (1) (1) sim, ainda fuma (2) nunca fumou (3) somente no passado

C2 O (a) Sr. (a) fuma ou já fumou maconha (marijuana), pelo menos uma vez por semana e pelo menos por 6 meses? (1) sim (2) não

HÁBITOS DE BEBIDA

D1 O (a) Sr. (a) já bebeu bebidas de álcool pelo menos 1 vez por mês? Se parou nos últimos 12 meses, a resposta é (1) sim, ainda bebe. (1) sim, ainda bebe (2) nunca (3) só no passado. Se **nunca**, pule para D3.

D2 Quando é que o (a) Sr. (a) bebe (bebia)? (1) nas refeições (2) entre as refeições (3) ambos

D3 O (a) Sr. (a) tomava ou toma chimarrão habitualmente? Se parou nos últimos 12 meses, a resposta é (1) sim, ainda toma. (1) sim, ainda (2) nunca (3) só no passado. Se **nunca**, pule para a E1.

HÁBITOS SEXUAIS – E1 O (a) Sr. (a) já esteve casado(a) ou vivendo junto com alguém? (1) sim (2) não. Se **não**, pule para F1

E2 O (a) Sr. (a) ainda é casado(a) ou vive como se fosse casado? ! (1) sim (2) separado ou divorciado (3) viúvo !

E3 Quantos anos o (a) Sr. (a) tinha pela primeira vez que casou ou viveu como casado? !

E4 No total, quantos filhos o (a) Sr. (a) teve?

E5 No total, quantos parceiros sexuais o (a) Sr. (a) já teve? (regulares e casuais)

E6 Se difícil de responder (1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) Mais de 100

HISTÓRIA DE DOENÇAS – F1 O (a) Sr. (a) já teve verrugas na pele? (1) sim (2) não (9) não sei Se **não**, pule para F6. Se a resposta for **sim**, onde? (9) não sei

F2 Mãos..... F3 Pés.... F4 Cabeça e pescoço.... F5 Outros lugares? (especifique).

F6 O (a) Sr. (a) já teve sapinho (Monília, Candida Albicans)?..... (1) sim (2) não (9) não sei Se **não**, pule para G10.

Se a resposta for **sim**, onde? (1) sim (2) não (9) não sei F7 Genital (nas partes) F8 Boca

F10 O (a) Sr. (a) já teve lesões de herpes (boqueira)? (1) sim (2) não (9) não sei Se **não**, pule para F14

Se a resposta for **sim**, onde? (1) sim (2) não (9) não sei

F11 Lábio F12 Genital (nas partes) F13 Outros lugares? (especifique)...

F14 O (a) Sr. (a) já teve alguma doença venérea (pegada, sexualmente transmissível)?..... (1) sim (2) não (9) não sei Se **não**, pule para F19. Se a resposta for **sim**, onde? (1) sim (2) não (9) não sei

F15 Sífilis-cancro F16 Gonorréia-corrimento..... F17 Condiloma-verrugas F18 HIV-AIDS

O (a) Sr. (a) já teve algum problema com a voz (rouquidão, por exemplo) que tenha feito o (a) Sr. (a) procurar o médico? (1) sim (2) não Se **não**, pule para a G1. Se **sim**, quais?

F19 Laringite aguda obstrutiva (crúpe).....

F20 Laringite crônica.....

F21 Pólipo de corda vocal ou de laringe.....

F22 Nódulo de corda vocal.....☐
F23 Edema ou estenose de laringe.....☐ **F24** Abscesso ou granuloma de cordas.....☐
F25 Abscesso de retrofaringe ou parafaringe.....☐ **F26** Outras:☐

HISTÓRIA DE CÂNCER NA FAMÍLIA – G1 Quantos irmãos o (a) Sr. (a) teve?☐

G2 Quantas irmãs o (a) Sr. (a) teve?☐ **G3** Quantos filhos o (a) Sr. (a) teve?☐
G4 Quantas filhas o (a) Sr. (a) teve?☐ **G5** Quantas(os) companheiras(os) o (a) Sr. (a) teve?.....☐

SAÚDE DA BOCA – H1 Com que frequência o (a) Sr. (a) escova seus dentes? ... ☐ (0) nunca (1) < uma vez por semana (2) 1-2 vezes por semana (3) um dia sim, outro não (4) uma vez ao dia (5) 2 vezes ao dia (6) 3 vezes ao dia (7) > 3 vezes ao dia (8) não se aplica (ir para G5)

H2 O que o (a) Sr. (a) usa para limpar seus dentes?☐ (1) escova dental (2) dedo (3) palito (4) fio dental
 (5) outros (especifique) (6) mais de uma resposta

H3 O que o (a) Sr. (a) usa junto com a escova dental?☐ (1) nada (2) pasta dental (3) outros (especifique)

H4 Suas gengivas sangram quando o (a) Sr. (a) escova os dentes?.....☐ (1) não (2) às vezes (3) sempre ou quase sempre

H5 Com que frequência o (a) Sr. (a) faz bochechos com antissépticos? ... ☐ (0) nunca (1) < uma vez por semana (2) 1-2 vezes por semana (3) um dia sim, outro não (4) uma vez ao dia (5) 2 vezes ao dia (6) 3 vezes ao dia (7) > 3 vezes ao dia

H6 O (a) Sr. (a) usa dentadura ou ponte?☐ (1) sim (2) não Se **não**, pule para **H9**

H7 É dentadura total (superior ou inferior)?☐ ! (1) sim (2) não !

H8 Com que idade o (a) Sr. (a) começou a usar dentadura?☐ !

H9 Durante os últimos 20 anos, com que frequência o (a) Sr. (a) tem ido ao dentista?.....☐
 (1) todo ano (2) a cada 2-5 anos (3) > cada 5 anos (4) nunca

H10 Antes da doença atual, o (a) Sr. (a) já fez alguma biópsia na sua boca ou laringe?.....☐ (1) sim (2) não Se **não**, pule para **H11**

H11 De que tipo?☐ (1) Boca (oral) (2) Laringe **H12** Com que idade?☐

H13 O que mostrou?☐ (1) normal (2) anormal (3) câncer (4) não sabe

HPV- II O Sr.(a) já tomou a vacina para o HPV? (1) sim (2) não (9) não sei. **I2** Nome da vacina: () Gardasil () Cervarix
 Se a resposta for **sim**, quais as idades da vacinação? ☐ ☐ ☐ ☐ () Outro (especifique)

I3 O Sr(a) já teve infecção pelo HPV? (1) sim (2) não (9) não sei

RESUMO DA HISTÓRIA MÉDICA - J1 O Sr.(a) tem alguma anomalia devido à Anemia de Fanconi?☐ (1) sim (2) não
 Se a resposta for **sim**, marque todas as que se aplicam:

() Cardíacas () Reprodutivas/Ginecol. () Respiratórias () Esqueléticas () Renais () Neurológicas () Endócrinas () Genitais
 () Polegar/Rádio () Crescimento () Orelhas/Audição () Olhos/Visão () Gastrointestinal () Pele () Outras (especifique)

J2 No caso de precisarmos de mais informações sobre uma anomalia específica, podemos entrar em contato com o seu médico? (1) sim (2) não

J3 O Sr(a) já teve alguma manifestação hematológica (baixa contagem de células sanguíneas)?☐ (1) sim (2) não

J4 Idade de início da diminuição da contagem de células sanguíneas.....☐ (1) 0-3 anos (2) 4-10 anos (3) mais de 10 anos

MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS – K1 Quando o Sr. (a) realizou seu último hemograma? ☐ ☐ ☐ ☐

Leucócitos Neutrófilos Hemoglobina Plaquetas

K2 O Sr. (a) realizou transfusão sanguínea nos últimos 3 meses?☐ (1) sim (2) não

K3 O Sr. (a) teve sangramentos nos últimos 3 meses?☐ (1) sim (2) não Se **sim**, especifique

K4 O Sr. (a) teve infecções recorrentes nos últimos 3 meses?☐ (1) sim (2) não Se **sim**, especifique

TERAPIA – L1 O Sr. (a) já recebeu algum dos seguintes tratamentos? *Andrógenos (1) sim (2) não Duração do tratamento:
 *Hormônios do crescimento (1) sim (2) não Duração do tratamento: *Transplante de medula óssea (TMO) (1) sim (2) não

Data do TMO ☐ ☐ ☐ ☐ **L2** – Foi realizada radioterapia?☐ (1) sim (2) não

L3 – Desenvolveu a Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH)?☐ (1) sim aguda (2) não (3) sim crônica

L4 – Medicação utilizada para tratar a DESCH:
 Frequência de uso:

L5 – Outras terapias (especifique):

Duração do tratamento (meses/anos):/.....

LESÕES BUCAIS VISÍVEIS

M1 O Sr.(a) já teve alguma lesão bucal visível que tenha permanecido por pelo menos 6 semanas?.....☐ (1) sim (2) não

M2 O Sr.(a) consultou um médico ou dentista sobre essa(s) lesão(ões)?.....☐ (1) sim (2) não

M3 Local(is) da(s) lesão(ões): Foi realizada biópsia?.....☐ (1) sim (2) não

M4 Tipo de lesão diagnosticada: () Leucoplasia () Eritroplasia () Doença do Enxerto contra o Hospedeiro () Infecção por fungos

() Infecção bacteriana () Infecção viral () Câncer () Desconhecido () Outra (especifique)

M5 Recebeu algum tratamento para a lesão visível)?.....☐ (1) sim (2) não Se **sim**, especifique

HISTÓRIA OCUPACIONAL: Por favor, relate todos os trabalhos que o (a) Sr. (a) já teve. Pense nas principais mudanças no seu trabalho, dentro da mesma companhia, como trabalhos separados. Ignore trabalhos que o (a) Sr. (a) teve por menos de 12 meses.

TRABALHO Nº1 do: ano ☐ ☐ ☐ ☐ ao: ano ☐ ☐ ☐ ☐
 dos: idade ☐ ☐ aos: idade ☐ ☐

Ocupação / Cargo

Companhia / Nome do empregador

Endereço ou Cidade:

Atividade / Produção

TRABALHO Nº2 do: ano ☐ ☐ ☐ ☐ ao: ano ☐ ☐ ☐ ☐
 dos: idade ☐ ☐ aos: idade ☐ ☐

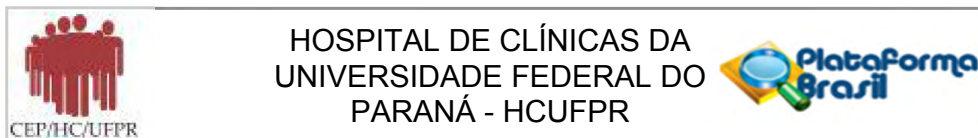
Ocupação / Cargo

Companhia / Nome do empregador

Endereço ou Cidade:

Atividade / Produção

ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – CEP/HC/UFPR, Nº: 1.101.574



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Genotípica dos Papilomavírus Humanos (HPV) Detectados em Lesões Tumoriais de Cabeça e Pescoço

Pesquisador: Sonia Mara Raboni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45066715.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.101.574

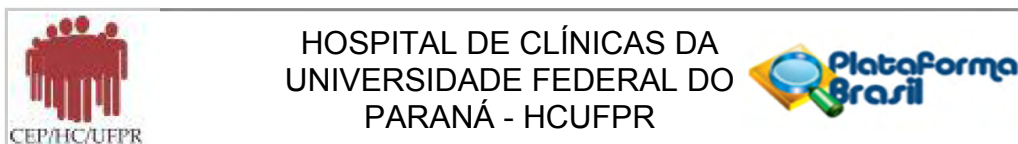
Data da Relatoria: 25/05/2015

Apresentação do Projeto:

O estudo apresentado trata-se Projeto de Doutorado de Magda Eline Guerrart Portugal (odontologia), sob orientação da pesquisadora Sônia Raboni, além das pesquisadoras Profas. Dras. Meri Bordignon Nogueirae e Luine Rosele Renaud Vidal.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que o número anual de casos novos de câncer no mundo passou de 10 milhões em 2000 e, em 2020, ultrapassara 15 milhões, sendo que a maior parte dos casos novos, aproximadamente 60%, aconteceu em regiões menos desenvolvidas. Embora a incidência dos tumores de cavidade oral e laringe tenha diminuído nas últimas duas décadas, os índices mundiais de tumores de orofaringe aumentaram em média 2,9% ao ano entre 2001 e 2010. Tal aumento pode ser reflexo de mudanças no comportamento que aumentem a exposição ao papilomavírus humano (HPV). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, era de 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Para o câncer de laringe, as estimativas brasileiras eram de 6.870 casos novos em homens e 770 em mulheres. Mais de 90% dos tumores de cavidade oral, orofaringe, faringe e laringe têm sua origem nas células do epitélio escamoso e estão associados ao HPV. O HPV é um membro da família Papillomaviridae, composta por vírus DNA comumente encontrados em aves e mamíferos. O

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181		CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória		
UF: PR	Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041	E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.101.574

gnoma do HPV consiste de uma pequena dupla fita de DNA de aproximadamente 8.000 pares de base (pb), dividido em três regiões principais (região de genes de expressão precoce, genes E1 a E7, região de genes de expressão tardia, proteínas maior (L1) e menor (L2) do capsídeo viral e região longa de controle (LCR) que contém os elementos reguladores da transcrição e replicação. O potencial carcinogênico do HPV está relacionado, principalmente, à atividade das proteínas E6 e E7, responsáveis pelo processo de imortalização celular. Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) relacionados ao HPV apresentam fatores de risco distintos daqueles não relacionados ao HPV, sendo biológica e clinicamente distintos dos CCECP causados por tabaco e álcool, tanto na resposta à radio e quimioterapia quanto no desfecho clínico. Assim, a detecção da frequência e identificação dos genótipos de HPV nos tumores de cabeça e pescoço, associadas ao estudo das características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com neoplasias relacionadas ao HPV e sua correlação com as não relacionadas ao HPV, poderão nortear o desenvolvimento de estratégias de prevenção e detecção precoce do vírus, bem como de protocolos de intervenção clínica, o que poderia diminuir a incidência da infecção, os custos do tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente.

Hipótese:

H0: Não há associação entre genótipos de HPV e neoplasia de cabeça e pescoço.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Identificar os genótipos de HPV encontrados em lesões tumorais de cabeça e pescoço.

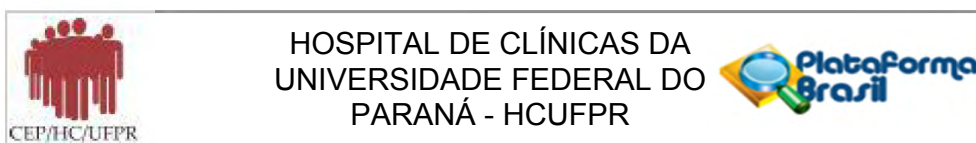
Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de HPV em material de biópsia de pacientes com lesões tumorais de cabeça e pescoço.
- Identificar genótipos de HPV por meio de sequenciamento nucleotídico viral dos produtos da PCR.
- Comparar os segmentos obtidos com sequências de referência para análise genotípica do HPV.
- Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com lesões tumorais de cabeça e pescoço.
- Correlacionar as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes infectados com os diferentes genótipos de HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181		CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória		
UF: PR	Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041	E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.101.574

A pesquisa não propõe a realização de nenhum procedimento no paciente. Serão utilizadas as amostras de pacientes que realizaram endoscopia peroral com biópsia. Portanto, não haverá risco para o paciente.

Benefícios:

Como não serão realizadas intervenções nos pacientes, a pesquisa não trará benefícios aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo analítico, observacional, transversal, com coleta retrospectiva e prospectiva de dados, em que não serão feitas intervenções no atendimento dos pacientes. Serão avaliadas amostras clínicas provenientes de material embocado em parafina ou tecido fresco de pacientes que realizaram endoscopia peroral com biópsia a partir do ano de 2010.

Os critérios de inclusão e exclusão estão claros e delimitados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram apresentados e o estudo se apresenta estruturado e coerente em relação à ética na pesquisa envolvendo seres humanos.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora apresentou todos os documentos e o estudo pode ser aprovado.

Projeto e documentações apresentados de forma adequada.

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

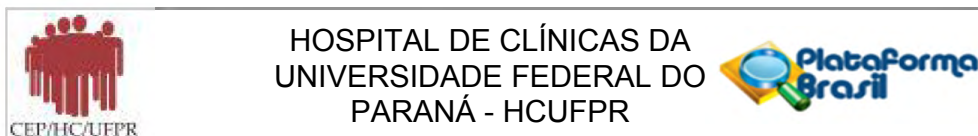
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.101.574

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

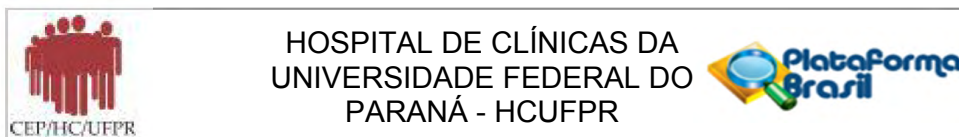
É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CURITIBA, 10 de Junho de 2015

Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória
UF: PR **Município:** CURITIBA **CEP:** 80.060-900
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

ANEXO 3 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – CEP/HC/UFPR, Nº: 1.342.916



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Genotípica dos Papilomavírus Humanos (HPV) Detectados em Lesões Tumorais de Cabeça e Pescoço

Pesquisador: Sonia Mara Raboni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45066715.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.342.916

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo analítico, observacional, transversal, com coleta retrospectiva e prospectiva de dados, em que não serão feitas intervenções no atendimento dos pacientes. Serão avaliadas amostras clínicas provenientes de material embocado em parafina ou tecido fresco de pacientes que realizaram endoscopia peroral com biópsia a partir do ano de 2010.

A relação do HPV com as lesões pré-malignas e neoplasias de cabeça e pescoço já está bem estabelecida, mas os mecanismos moleculares da carcinogênese mediada pelo HPV ainda não são bem compreendidos. Assim, a detecção precoce, associada ao estudo das características demográficas, epidemiológicas e clínicas do paciente são fatores importantes, não apenas no estabelecimento do prognóstico e determinação da conduta clínica, mas também na instituição de medidas efetivas de prevenção.

Objetivo da Pesquisa:

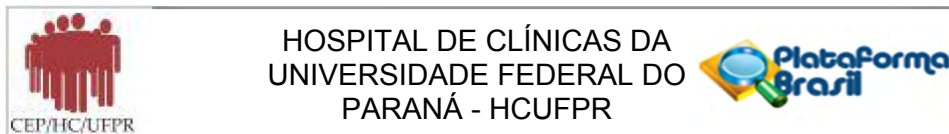
Objetivo Primário:

Identificar os genótipos de HPV encontrados em lesões tumorais de cabeça e pescoço.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a frequência de HPV em material de biópsia ou raspado oral de pacientes com lesões tumorais de cabeça e pescoço.- Identificar genótipos de HPV por meio de sequenciamento

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181		CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória		
UF: PR	Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041	E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.342.916

nucleotídico viral dos produtos da PCR.- Comparar os segmentos obtidos com sequências de referência para análise genética do HPV.- Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com lesões tumorais de cabeça e pescoço.- Correlacionar as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes infectados com os diferentes genótipos de HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As avaliações dos riscos e dos benefícios não foram alterados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora Profa. Dra. Sonia Mara Raboni solicitou emenda com as seguintes alterações:

- Inclusão dos novos pesquisadores.
- Inclusão do Serviço de TMO do HC/UFPR, com a respectiva carta de autorização anexada.
- Inclusão do Hospital Erasto Gaertner, como instituição co-participante, tendo sido anexado documento com projeto nas normas do CEP do Hospital Erasto Gaertner, bem como carta de autorização da referida instituição.
- Inclusão de raspado de lesão de mucosa oral para realizar a pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram anexados na Plataforma.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

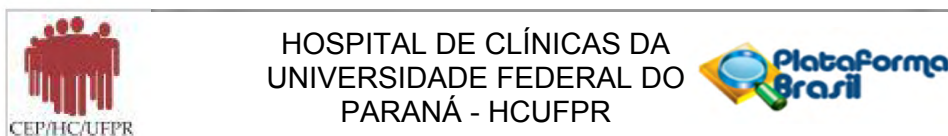
Emenda recebida e analisada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda. Devendo o pesquisador aguardar o parecer final da CONEP sobre o referido documento.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181	CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041
	E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.342.916

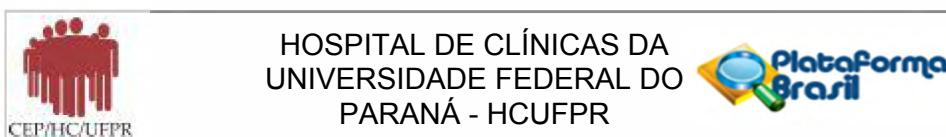
arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_624318 E1.pdf	25/11/2015 11:56:26		Aceito
Outros	Carta_solic_erasto.pdf	25/11/2015 11:50:04	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	autorz_anat_patol_erasto.pdf	25/11/2015 11:49:17	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Projeto_HPV_Erasto_25_11_15.pdf	25/11/2015 11:38:36	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Decla_autor_Cabeca_Pescoco_Erasto.pdf	25/11/2015 11:34:34	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Carta_autoriz_TMO_HC_UFPR.pdf	25/11/2015 11:31:43	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Carta_EMENDA_1_Proj_HPV_assina.pdf	25/11/2015 11:29:52	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_HPV_CEP_HC_Emenda_1.pdf	25/11/2015 11:27:46	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Compromisso pesquisa.pdf	06/05/2015 16:49:19		Aceito
Outros	Projeto HPV Check list .pdf	06/05/2015 16:48:26		Aceito
Outros	12 guarda mat biolo.pdf	06/05/2015 16:48:03		Aceito
Outros	11 qualif pesquisadores.pdf	06/05/2015 16:47:52		Aceito
Outros	9 Compr pesquisadores.pdf	06/05/2015 16:47:13		Aceito
Outros	8 Termo comp prontuarios.pdf	06/05/2015 16:47:05		Aceito
Outros	7 Declar uso material.pdf	06/05/2015 16:46:56		Aceito
Outros	6 Decl publ resul.pdf	06/05/2015 16:46:45		Aceito
Outros	5 Termo conf.pdf	06/05/2015		Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.342.916

Outros	5 Termo conf.pdf	16:46:30		Aceito
Outros	Declaracao UAD.pdf	06/05/2015 16:46:02		Aceito
Outros	4 Dec conc end peroral.pdf	06/05/2015 16:45:24		Aceito
Outros	1 Carta encaminh CEP.pdf	06/05/2015 16:44:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE HPV.pdf	06/05/2015 16:44:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE HPV_adulto.pdf	06/05/2015 16:44:16		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	06/05/2015 16:36:16		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 30 de Novembro de 2015

Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

**ANEXO 4 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER / LIGA
PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER – CEP/HEG,
Nº 1.508.287**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Genotípica dos Papilomavírus Humanos (HPV) Detectados em Lesões Tumorais de Cabeça e Pescoço

Pesquisador: Sonia Mara Raboni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45066715.0.3001.0098

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.508.287

Apresentação do Projeto:

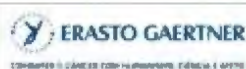
Introdução:

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que o número anual de casos novos de câncer no mundo passou de 10 milhões em 2000 e, em 2020, ultrapassara 15 milhões, sendo que a maior parte dos casos novos, aproximadamente 60%, aconteceu em regiões menos desenvolvidas (WHO, 2002). Embora a incidência dos tumores de cavidade oral e laringe tenha diminuído nas últimas duas décadas, os índices mundiais de tumores de orofaringe aumentaram em média 2,9% ao ano entre 2001 e 2010 (HOWLADER et al., 2010). Tal aumento pode ser reflexo de mudanças no comportamento que aumentem a exposição ao papilomavírus humano (HPV) (CHATUVERDI et al., 2008). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, era de 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2014). Para o câncer de laringe, as estimativas brasileiras eram de 6.870 casos novos em homens e 770 em mulheres (INCA, 2014). Mais de 90% dos tumores de cavidade oral, orofaringe, faringe e laringe têm sua origem nas células do epitélio escamoso e estão associados ao HPV (CARVALHO et al., 2005; FURNIS et al., 2009; GILLISON et al., 2000; SMITH et al., 1998). Além disso, os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) relacionados ao HPV apresentam fatores de risco distintos daqueles não relacionados ao HPV, sendo biológica e clinicamente distintos dos CCECP.

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpec.org.br



LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.508.287

causados por tabaco e álcool, tanto na resposta à radio e quimioterapia quanto no desfecho clínico (APPLEBAUM et al., 2007; GILLISON et al., 2008). Assim, a detecção da frequência e identificação dos genótipos de HPV nos tumores de cabeça e pescoço, associadas ao estudo das características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com neoplasias relacionadas ao HPV e sua correlação com as não relacionadas ao HPV, poderão nortear o desenvolvimento de estratégias de prevenção e detecção precoce do vírus, bem como de protocolos de intervenção clínica, o que poderia diminuir a incidência da infecção, os custos do tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente. O HPV é um membro da família Papillomaviridae, composta por vírus DNA comumente encontrados em aves e mamíferos (DE VILLIERS et al., 2004). O genoma do HPV consiste de uma pequena dupla fita de DNA de aproximadamente 8.000 pares de base (pb), dividido em três regiões principais. A primeira é composta por genes de expressão precoce (genes E1 a E7), que são expressos no início do ciclo viral, sendo responsáveis pela regulação da transcrição, replicação plasmidial e transformação. Os genes de expressão tardia codificam as proteínas maior (L1) e menor (L2) do capsídeo viral, que estão envolvidas no empacotamento do genoma do vírus e na liberação da partícula viral. A terceira região do genoma é denominada de região longa de controle (LCR) e contém os elementos reguladores da transcrição e replicação (MUNOZ et al., 2006). Considerando apenas os estudos em humanos, aproximadamente 100 tipos de HPV já foram descritos com base na composição nucleotídica do gene L1 (DE VILLIERS et al., 2004). Esses vírus são classificados como do tipo mucoso (cuja maioria é do gênero alfa) ou cutâneo (com maioria pertencendo ao gênero beta) com base no tropismo para cada epitélio. De acordo com a capacidade de promover a malignização da célula hospedeira, os HPV são agrupados como de baixo ou alto risco. Destes, os principais representantes são os HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. Entre os tipos de baixo risco oncogênico encontram-se os HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 (DE VILLIERS et al., 2004). Nas infecções da cavidade oral, o HPV-16 é tipo mais prevalente, representando mais de 90% da distribuição genética encontrada nos tumores de tonsilas palatinas (KERO et al., 2012; ST GUILY et al., 2011). O potencial carcinogênico do HPV está relacionado, principalmente, à atividade das proteínas E6 e E7, responsáveis pelo processo de imortalização celular. A proteína E6 induz a proteólise mediada por ubiquitina, levando à degradação da proteína p53 (proteína supressora tumoral), e a proteína E7 inativa as proteínas supressoras tumorais da família retinoblastoma (pRb), desregulando o ciclo celular (LIU et al., 2006; THOMAS et al., 1999). A relação do HPV com as neoplasias de cabeça e pescoço já está bem estabelecida, mas os mecanismos moleculares da carcinogênese mediada pelo HPV ainda não são bem compreendidos. Assim, a detecção precoce, associada ao estudo das

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br



LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.508.287

características demográficas, epidemiológicas e clínicas do paciente são fatores importantes, não apenas no estabelecimento do prognóstico, mas também na instituição de medidas efetivas de prevenção.

Hipótese:

Não há associação entre genótipos de HPV e neoplasia de cabeça e pescoço.

Metodologia:

As variáveis serão analisadas por meio de estatística descritiva e analítica. Na análise das variáveis quantitativas serão obtidas as frequências absolutas e relativas, além de calcular os valores de mediana com seus intervalos interquartis e médias com os respectivos desvios-padrão. Os dados serão compilados utilizando-se o software JMP versão 5.2.1 e analisados por meio do software Graph Pad Prism versão 5.03. Teste de qui-quadrado ou teste de Fisher serão utilizados para analisar as diferenças entre os grupos, enquanto o teste de Mann Whitney será empregado para as variáveis contínuas, quando apropriado. Será adotado intervalo de confiança de 95% e os valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar os genótipos de HPV encontrados em lesões tumorais de cabeça e pescoço.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a frequência de HPV em material de biópsia ou raspado oral de pacientes com lesões tumorais de cabeça e pescoço.- Identificar genótipos de HPV por meio de sequenciamento nucleotídico viral dos produtos da PCR.- Comparar os segmentos obtidos com sequências de referência para análise genética do HPV.- Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com lesões tumorais de cabeça e pescoço.- Correlacionar as características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes infectados com os diferentes genótipos de HPV. População do estudo: - Para a realização deste estudo serão utilizadas 3 tipos de amostras: 1. Amostras de pacientes que realizaram endoscopia peroral, com biópsia (tecido fresco), nos serviços de Endoscopia Peroral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e Cabeça e Pescoço do Hospital Erasto Gaertner. 2. Amostras de raspados orais de lesões pre-malignas e malignas de pacientes atendidos no serviço de Transplante de Medula Ossea do (HC-UFPR). 3. Amostras de tecidos emblocados em parafina, com

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br



LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.508.287

diagnostico de lesões pre-malignas e neoplasias de cabeça e pescoço, disponíveis nos serviços de Anatomia Patológica do HC-UFPR e do Hospital Erasto Gaertner. As variantes retiradas dessa seleção serão: número de identificação; sexo; data de nascimento; raça; naturalidade; procedência; escolaridade; uso de drogas; comportamento sexual; número de parceiros; tabagismo; abuso de álcool, bem como o sítio primário da lesão (cavidade bucal, orofaringe, hipofaringe e laringe), o estadiamento clínico dos pacientes (segundo o American Joint Committee on Cancer), o grau de diferenciação do tumor (segundo a Organização Mundial de Saúde: bem, moderadamente e pouco diferenciado), tratamentos radio e quimioterápicos e evolução clínica (cura, óbito). Métodos - Extração de DNA de biópsias: A extração do DNA de biópsias (tecido fresco) será realizada com a utilização de reagentes comerciais como o Kit Purelink Genomic DNA extraction kit (Invitrogen®) seguindo as especificações do fabricante. Após a extração, as amostras com o DNA extraído serão quantificadas utilizando espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Extração de DNA de tecido emblocado em parafina utilizando xilol: A partir do material obtido de biópsias das lesões selecionadas, previamente fixado em formol 10% e emblocado em parafina, serão obtidos cortes de 5 µm de espessura. Os cortes serão coletados em tubos de polipropileno de 1,5 ml e a parafina será removida com a utilização de xilol. O tecido seco será submetido à digestão enzimática adicionando-se 300 µl de Proteinase-K (PK) e DodecilSulfato de Sódio (SDS) para uma concentração final de 0,1%, seguido de incubação por 48 horas a 55°C, com leve agitação. Serão adicionados 5 µl de PK 2,0% nas amostras após 24 horas, se ainda houver tecido para ser digerido. Após esse período, a extração do DNA será realizada com a utilização de reagentes comerciais como o Kit Purelink Genomic DNA extraction kit (Invitrogen®) seguindo as especificações do fabricante. Após a extração, as amostras com o DNA extraído serão quantificadas utilizando espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Amplificação do gene da -globina humana - Para analisar qualitativamente as amostras com DNA extraído a partir do material obtido de biópsias das lesões selecionadas, será realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da -globina humana, com os oligonucleotídeos iniciadores (primers) GH20/PC04 (BELL et al., 1993). O fragmento da PCR de aproximadamente 264 pares de base (pb) será analisado em gel de agarose 1%.- Amplificação do material genético do HPV Para detectar a presença do HPV no material genético extraído, a estratégia será amplificar a região do genoma que codifica a proteína estrutural L1 (L1 gene). Para isso, será realizada a técnica de semi-nested PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) SB01/SB02 (COZER et al., 2011) e MY09.- Purificação do produto de PCR O produto da PCR obtido será purificado utilizando-se o PureLink® Viral RNA/DNA Kits – Invitrogen, obedecendo às especificações do fabricante. Essa etapa é

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br



LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.508.287

necessária para remoção de excesso de dNTP e iniciadores, além de permitir mensurar a quantidade de DNA que foi purificado e também, avaliar a qualidade da purificação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa não propõe a realização de nenhum procedimento no paciente. Serão utilizadas as amostras de pacientes que realizaram endoscopia peroral com biópsia. Portanto, não haverá risco para o paciente.

Benefícios:

Como não serão realizadas intervenções nos pacientes, a pesquisa não trará benefícios aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para este projeto nada consta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos e consideracoes apresentado satisfatoriamente.

Recomendações:

Sem recomendações, projeto aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo conforme itens acima analisados, sem lista de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: "Caracterização Genotípica dos Papilomavírus Humanos (HPV) Detectados em Lesões Tumoriais de Cabeça e Pescoço.", cujo número de protocolo é P.P. nº 2484 e tem como pesquisador responsável V. Sa. Foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e foi Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_643482 E2.pdf	15/02/2016 22:42:59		Aceito
Outros	Emenda_2_Carta.pdf	15/02/2016 22:40:17	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Carta_solic_erasto.pdf	25/11/2015	Magda Eline	Aceito

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br



LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.508.287

Outros	Carta_solic_erasto.pdf	11:50:04	Guerrart Portugal	Aceito
Outros	autorz_anat_patol_erasto.pdf	25/11/2015 11:49:17	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Projeto_HPV_Erasto_25_11_15.pdf	25/11/2015 11:38:36	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Decla_autor_Cabeca_Pescoco_Erasto.pdf	25/11/2015 11:34:34	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Carta_autoriz_TMO_HC_UFPR.pdf	25/11/2015 11:31:43	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Carta_EMENDA_1_Proj_HPV_assina.pdf	25/11/2015 11:29:52	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_HPV_CEP_HC_Emenda_1.pdf	25/11/2015 11:27:46	Magda Eline Guerrart Portugal	Aceito
Outros	Compromisso pesquisa.pdf	06/05/2015 16:49:19		Aceito
Outros	Projeto HPV Check list .pdf	06/05/2015 16:48:26		Aceito
Outros	12 guarda mat biolo.pdf	06/05/2015 16:48:03		Aceito
Outros	11 qualif pesquisadores.pdf	06/05/2015 16:47:52		Aceito
Outros	9 Compr pesquisadores.pdf	06/05/2015 16:47:13		Aceito
Outros	8 Termo comp prontuarios.pdf	06/05/2015 16:47:05		Aceito
Outros	7 Declar uso material.pdf	06/05/2015 16:46:56		Aceito
Outros	6 Decl publ resul.pdf	06/05/2015 16:46:45		Aceito
Outros	5 Termo conf.pdf	06/05/2015 16:46:30		Aceito
Outros	Declaracao UAD.pdf	06/05/2015 16:46:02		Aceito
Outros	4 Dec conc end peroral.pdf	06/05/2015 16:45:24		Aceito
Outros	1 Carta encaminham CEP.pdf	06/05/2015 16:44:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE HPV.pdf	06/05/2015 16:44:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE HPV_adulto.pdf	06/05/2015 16:44:16		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	06/05/2015		Aceito

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

CEP: 81.520-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

E-mail: cep@lpcc.org.br

 ERASTO GAERTNER <small>apresentar o câncer com humanismo, ciência e amor</small>	LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER	
--	---	---

Continuação do Parecer: 1.508.287

Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	16:36:16	Aceito
----------------	--------------------	----------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 20 de Abril de 2016

Assinado por:
Jordan Zanetti Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201 Bairro: Jardim das Américas UF: PR Município: CURITIBA Telefone: (41)3361-5271	CEP: 81.520-060 E-mail: cep@lpcc.org.br
--	--

ANEXO 5 – PUBLICAÇÃO



Received: 6 August 2018 | Revised: 16 October 2018 | Accepted: 6 November 2018

DOI: 10.1111/tid.13030

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

High frequency of multiple HPV types detection in Fanconi anemia patients' oral swabs

Magda Eline Guerrart Portugal^{1,2,3}  | Sonia Mara Raboni^{1,2,4}  | Meri Bordignon Nogueira² | Luine Rosele Renaud Vidal² | Amanda Helena Dingueleski³ | Edelaine Kluk³ | Carmem Bonfim⁵ | Lisandro Lima Ribeiro⁵ | Cassius Carvalho Torres-Pereira⁶

¹Postgraduate Program in Internal Medicine and Health Science, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

²Laboratory of Virology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

³Herrero Faculty – Dentistry Graduation Course, Curitiba, Brazil

⁴Infectious Diseases Division, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁵Bone Marrow Transplant Division, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

⁶Department of Stomatology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Correspondence

Sonia Mara Raboni, Postgraduate Program in Internal Medicine and Health Science, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. Email: sraboni@ufpr.br

Funding information

This work was financially supported by CNPq, Brazilian National Council for Research and Development and Fundação Araucária, Project number: 006/2017.

Abstract

Background: Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease usually characterized by bone marrow failure and congenital malformations. The risk of development of malignancies in the oral cavity of FA patients, such as squamous cell carcinoma (SCC), increases significantly after a hematopoietic stem cells transplant (HSCT), and may also be linked with the presence of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity. We investigated the prevalence and the HPV genotypes in oral mucosa of Brazilian FA patients.

Methods and results: Oral swabs of 49 FA patients were collected. The median age of patients was 20 years (range 5–44) and 57% were over 18 years. Oral lesions were present in 20% of all patients, being 90% leukoplakia. HPV DNA was detected in 28% (14/49) of patients, and one of them also reported genital HPV lesions. Sixty-seven percent of all patients had undergone HSCT, including 12 patients (86%) of those with HPV results. Multiple HPV types were detected in 78% and 71% of HPV samples by Sanger sequencing and reverse hybridization methods, respectively. The most prevalent HPV types detected were 6, 11, 18, and 68.

Conclusions: HPV prevalence in the oral mucosa of the assessed FA patients was higher than reported in the general population. Additional studies with collection of sequential samples are needed to know the natural history of the presence of multiple HPV types in these individuals and its association with the development of tumors, to evaluate the implementation of preventive measures, such as vaccination, and to guide early treatment.

KEYWORDS

Fanconi anemia, genotypes, human papillomavirus

1 | INTRODUCTION

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease associated with bone marrow failure, developmental abnormalities, congenital malformations, and an increased risk of epithelial malignancies.^{1–3} Studies

with cell lines from different FA patients led to the description of 22 genes,^{4,5} nominated FA genes.

Although overall survival has been increased since the advent of hematopoietic stem cells transplant (HSCT),^{6,7} the risk of squamous cell carcinomas (SCC) in the oral cavity, esophagus, and the

anogenital region is greatly increased in FA patients, with a much earlier onset.^{3,7-10}

Besides tobacco and alcohol, HPV infection caused by some specific genotypes is also a well-known risk factor for SCC. HPV onco-genes E6 and E7, after randomly integrating the host genome, are responsible for genome instability that could play the most important role in HPV-induced carcinogenesis in FA patients.^{11,12}

Lowy and Gillison¹³ suggested that the period between HPV infection and the development of cancer may be considerably shorter in FA patients, which could explain the occurrence of head and neck SCC (HNSCC) or vulvar cancer in relatively young FA patients. While some studies have failed to detect HPV DNA in HNSCC and anogenital SCC samples from subjects with FA,^{14,15} some epidemiological studies continue to provide evidence of risk.¹⁶

On the one hand, the risk of development of malignancies in the oral cavity of FA patients increases significantly after HSCT⁸⁻¹⁰; and the presence of HPV infection in the oral cavity seems to increase this risk, with some studies reporting by three times in FA patients. Therefore, this study aimed to investigate the prevalence and identify HPV genotypes in oral mucosa of Brazilian FA patients.

2 | METHODS

2.1 | Study design

This is a case series study that enrolled 49 FA patients monitored at the Bone Marrow Transplantation Division at Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná (HC/UFPR). A form was used to collect clinical data and demographic and behavioral information provided by the patient, as well as to report clinical examinations performed by one dentist using a visual examination method. Additional clinical information was retrieved from medical records. The Institutional Ethics Review Board of the HC/UFPR approved the study and all participants signed informed consent (Number# 45066715.0.0000.0096).

2.2 | Patients and sample collection

The inclusion criteria were FA patients regardless of the presence or absence of oral lesions. Oral squamous cells were obtained with liquid-based cytology using flocked swabs and Universal Transport Medium—UTM™ (COPAN Diagnostics), as described by de Araujo et al.¹⁷

2.3 | DNA isolation

Buccal swabs were stored frozen at -20°C until DNA isolation using the PureLink® Genomic DNA extraction kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, with the modifications described by Dingueleski et al.

2.4 | Measurement of DNA purity

DNA purity was measured using a spectrophotometer DeNovix® DS-11+ (DeNovix Inc, Wilmington, DE, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.5 | Internal control amplification

All samples were evaluated in order to amplify internal control. The amplification of the human b-globin gene as described by Bell et al.¹⁹

2.6 | HPV detection

PCR amplification of the HPV L1 region was carried out using primers GP5+ (5' - TTTGTTACTGTGGTAGATACAC - 3') and GP6+ (5' - GAAAAATAAACTGTA AATCATATTC - 3'), as described by Jacobs et al.²⁰ PCR amplification reactions were performed in 50 µL, with the following components and final concentrations: 1× Taq buffer, 200 µmol/L deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.0 µmol/L of primers GP5+/GP6+, 1U Taq DNA polymerase, and DNA template. PCR reactions were amplified on a Veriti 96-Well (Applied Biosystems®, Waltham, MA, USA) using the TDP4 touchdown cycling conditions described by Evans et al.²¹. An HPV-positive control and a negative PCR control were included in each run. Amplicons were analyzed by electrophoreses in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide and photographed under UV light using UVP® system.

2.7 | DNA sequencing and HPV genotyping

HPV-positive samples were sequenced with a BigDye kit (ABIPrisms™—Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions and according to the method described by Sanger et al.²² The sequences obtained were genotyped using the Mixed Sequence Reader online tool.²³ Samples were also genotyped by a reverse hybridization method using the commercial XGEN kit (Mobiuslife, Brazil). The XGEN HPV genotyping assay is based on the amplification of at least 36 HPV genotypes with biotinylated PCR primers targeting the viral L1 region. After PCR reactions, the amplicons were genotyped using the reverse hybridization assay (Dot Blot) with specific DNA probes immobilized in a chip with a nylon membrane (Flow-Chip technology) in a HybriSpot 12 (HS12, Vitro Group®, Curitiba, Paraná, Brazil) instrument. The signal emitted by the chip was captured and analyzed by the Hybrisoft 12 software. An HPV-positive control and a negative PCR control were included in each run.

2.8 | Statistical analysis

Descriptive analysis was performed for all variables. Data were analyzed by the GraphPad Prism software version 5.03. Bivariate analysis was performed to determine possible factors associated with HPV detection. Fisher's exact or χ^2 tests were used to assess differences between groups, and a Mann-Whitney test was used for continuous variables. The measure of association was the Odds Ratio (OR), considering a 95% confidence interval. Results of continuous data are expressed as median ± interquartile range (IQR). All *P* values were two-tailed, and the level of significance was set at 0.05.

TABLE 1 Clinical and epidemiological profiles of FA patients, positive or negative for HPV

Characteristic	HPV positive n = 14 (%)	HPV negative n = 35 (%)	All cases n = 49 (%)	P value
Gender				
Male	5 (36)	19 (54)	24 (49)	0.345 ^a
Female	9 (64)	16 (46)	25 (51)	
Patients' age (y)				
Median (IQR)	20 (5-34)	21 (9-44)	20 (5-44)	0.714 ^b
Oral lesion				
Leukoplakia	1 (7)	8 (23)	9 (18)	NA
Other	0 (-)	1 (3)	(2)	
Reported verrucous				
HPV Lesion				
Genital	1 (7)	2 (6)	3 (6)	NA
Buccal	0 (-)	0 (-)	0 (-)	
Other locations	2 (14)	7 (20)	9 (18)	
HSCT				
Yes	12 (86)	21 (60)	33 (67)	0.103 ^a
No	2 (14)	14 (40)	16 (33)	
Herpes simplex				
Yes	2 (14)	13 (37)	16 (33)	0.162 ^a
No	11 (79)	18 (52)	28 (57)	
NI	1 (7)	4 (11)	5 (10)	
Candidiasis				
Yes	3 (21)	7 (20)	10 (20)	1.00 ^a
No	11 (79)	22 (63)	33 (68)	
NI	0 (-)	6 (17)	6 (12)	
Alcohol consumption				
Yes	3 (21)	12 (34)	15 (31)	0.321 ^a
No	11 (79)	19 (54)	30 (61)	
NI	0 (-)	4 (12)	4 (8)	
Tobacco use				
Yes	2 (14)	5 (14)	7 (14)	1.00 ^a
No	12 (86)	29 (83)	41 (84)	
NI	0 (-)	1 (3)	1 (2)	

IQR, interquartile range; HSCT, hematopoietic stem cells transplant.

^aFisher's exact test.^bMann-Whitney test.

3 | RESULTS

HPV DNA was detected in 14 of a total of 49 patients (28%). Sixty-seven percent (33/49) of all patients were bone marrow transplanted, including 12 patients (86%; 12/14) with positive-HPV results (Table 1).

The median age of studied patients was 20 years (range 5-44) and 57% were over 18 years old. Fifty-one percent of all patients were female (25/49), and 83% (41/49) reported having never smoked in their lifetime. Oral lesions were presented in 20% of

all patients (10/49) and, within this group, one of the patients was positive for HPV. Ninety percent of the oral lesions were idiopathic white patch or leukoplakia, which is an area of keratosis that appears as adherent white spots on the mucous membranes of the oral cavity. None of the patients presented lesions suggestive of in situ cancer. No statistical difference was observed between HPV-positive and negative patients (Table 1).

A total of 28% of the samples were HPV-positive, and the most prevalent genotypes were HPV 6 and 11, followed by HPV types 18 and 68. When comparing both methodologies, some distinct

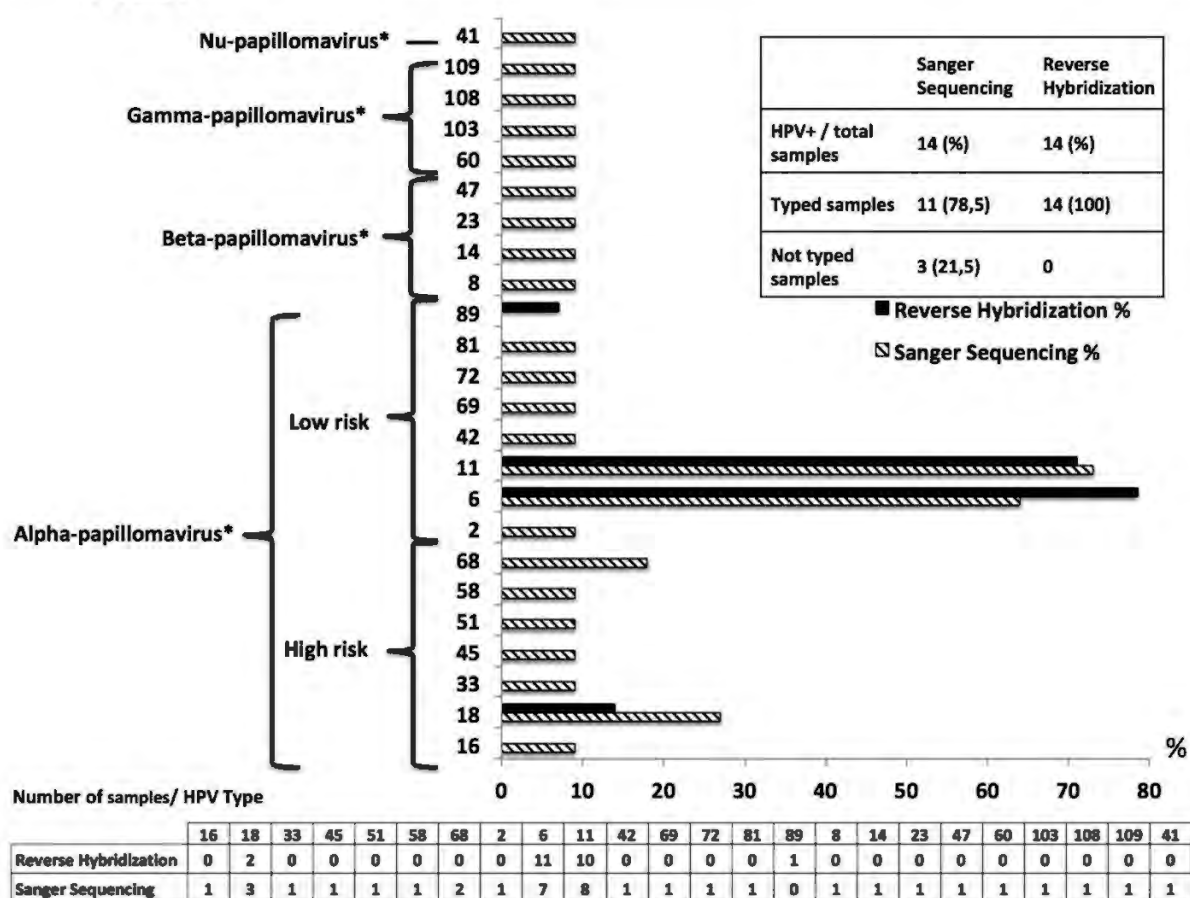


FIGURE 1 Frequency of the HPV types detected by Sanger²² sequencing and reverse hybridization. *As described by de Villiers et al,³⁰ Chen et al (2007), Nobre et al (2009), Ekström et al.³¹

frequencies of HPV types were observed. The HPV types and their frequencies are shown in Figure 1. Three HPV-positive samples were not typed by Sanger²² sequencing.

Multiple HPV types were detected in 78.5% of the HPV-positive samples typed with Sanger²² sequencing, with 67% ($n = 7$) of them harboring four HPV types. HPV-positive samples tested with reverse hybridization showed multiple HPV types in 71%, with 80% ($n = 8$) of them being infected by two HPV types and 20% ($n = 2$) with three HPV types, as shown in Table 2.

4 | DISCUSSION

In this case series study, 28% of the FA patients admitted to an HSCT reference center had HPV detected in the oral mucosa, which is higher than estimates from other studies with FA patients and also higher than estimates from studies with the general population, 7.5% to 11.1% and 6.9%, respectively.^{16,24,25}

However, a previous report with other Brazilian FA patients showed an HPV prevalence similar to that of our study, with rates

of 35% and 27% in patients with and without a history of HSCT, respectively.¹⁷ Moreover, it was not possible to identify risk factors associated with HPV detection among the studied patients.

Studies assessing HPV prevalence in FA patients have shown that it can vary among different FA populations. Sauter et al²⁴ reported an HPV prevalence of 11.1% (14/126) in FA patients at the Cincinnati Children's Fanconi Anemia Comprehensive Care Center (CCFACCC), Cincinnati, Ohio, USA. Other studies performed in the general population showed prevalence range of 7.5%²⁴ and 6.9%.²⁵ Since this study did not include a comparison group of patients without FA, and considering differences in sample size, age distributions, and oral sampling methods, comparisons among studies are difficult.

Putting aside the issue of the differences and similarities among FA populations, comparison of HPV prevalence studies is not straightforward even when only one HPV detection methodology is employed, since there is no gold standard method. Our study used the GP5+/GP6+ primer set that was first conceived to detect a wide range of HPV types by using a lowered annealing temperature during PCR.^{20,26} This primer set is derived from an elongation at the 3' ends of GP5 and GP6 primers, in order to

TABLE 2 HPV genotyping distribution in samples with multiple HPV types, in the studied population

Multiple HPV types	Total (%)	Sample ID	HPV types
Sanger ²² Sequencing	11 (78.5)		
Two HPV types	1 (9)	37	6 ^a , 42 ^a
Three HPV types	3 (27)	1	6 ^a , 11 ^a , 23 ^c
		46	6 ^a , 11 ^a , 69 ^a
Four HPV types	7 (64)	30	6 ^a , 11 ^a , 18 ^b , 109 ^d
		31	11 ^a , 16 ^b , 33 ^b , 60 ^d
		32	6 ^a , 11 ^a , 72 ^a , 108 ^d
		38	6 ^a , 14 ^b , 58 ^b , 68 ^b
		42	2 ^a , 8 ^c , 51 ^b , 103 ^d
		44	11 ^a , 18 ^b , 41 ^e , 68 ^b
		49	6 ^a , 11 ^a , 47 ^c , 81 ^a
Reverse hybridization	10 (71)		
Two HPV types	8 (80)	1	6 ^a , 11 ^a
		32	
		38	
		42	
		45	
		46	
		49	
		6	6 ^a , 89 ^a
Three HPV types	2 (20)	37	6 ^a , 11 ^a , 18 ^b
		44	

^aLow risk alpha-papillomavirus.^bHigh-risk alpha-papillomavirus.^cBeta-papillomavirus.^dGamma-papillomavirus.^eNu-papillomavirus.

improve HPV detection sensitivity by 10- to 100-fold, achieving phentograms level for those HPV genotypes that match strongly with the primers, for example HPV 16, and pictogram level for those HPV types with four or more mismatches with one or both

primers, for example HPV 39 and HPV 1. Since we used the touch-down PCR procedure, sensitivity for detecting HPV DNA may have been even further enhanced.²¹

Regarding HPV typing in the studied FA population, our results show that the most prevalent HPV types were HPV 6 and 11, followed by HPV types 18 and 68, while other studies reported HPV 6 and HPV 16 to be the most common types.^{17,24} Discrepancies among studies concerning HPV typing are common, not only due to differences among studied populations, but also, and perhaps mainly, due to the different HPV genotyping methods used.

Two approaches were used in order to genotype positive-HPV samples in this study. The first one comprised Sanger²² sequencing followed by Mixed Sequence Reader²³ software genotyping. When only a single type of HPV is present, a consensus sequence is built based on forward and reverse data and a phylogenetic analysis is accomplished according to standard procedures. This workflow of HPV genotype analysis is in accordance with other genotyping methods.

In this study, we submitted the obtained electropherogram to an analysis performed by the Mixed Sequence Reader²³ online tool, which was able to retrieve results of multiple HPV types with two, three, and even four HPV types, as was the case for seven typed samples. For some cases, different HPV types were retrieved from forward and reverse sequences from the same sample. This may be explained by a number of different factors. First, by the DNA ratio of the different HPV types present in each sample, coupled with the amplification efficiency of the PCR reaction for each of the target DNA sequences.²⁷ Second, the annealing properties of each primer used in a mixed sample reaction also affect the amount of PCR product. In fact, other studies showed that when multiple HPV DNAs with different amplification efficiencies are present in the same sample, selective amplification of one HPV DNA over another can occur.^{27,28}

The fact that some HPV genotypes that were detected by Sanger²² sequencing with random primers were not detected by reverse hybridization may be explained, at least in part, by variations during PCR due to differences in primers and probes sets between the two methodologies, when working with multiple HPV infected samples. This could also explain the finding of HPV-type 89 using hybridization, a type that was not identified by Sanger²² sequencing, and could also justify the differences regarding the number of HPV types found when multiple HPV types are present in the same sample. Reports on different results when positive-HPV mixed samples are typed using random PCR followed by sequencing or hybridization have already been made.^{27,29}

The methodological approach used in this study does not allow distinguishing HPV DNA fragments that are integrated into the host genome from the episomal ones, making it impossible to determine which ones are actually expressing their genes in the host cell. However the clinical significance of our results may be the emphasis put on the importance of constant HPV surveillance in FA patients with at least two different approaches, in order to detect and genotype HPV-positive samples, as well as the displaying of the importance of studying the role of the presence of multiple HPV types in the development of malignancies.

The alpha-papillomavirus types 16, 33, 45, 51, 58, and 68 detected in our study are all associated with high-risk of malignant lesions,³⁰ what stresses that the surveillance of these cases is essential; that is also the case for the low-risk HPV types 6, 11, 42, 69, 72, 81, and 89. Moreover, even in those cases where the detected-HPV types are not classically associated with carcinogenesis in mucous tissues,^{30,31} the impact of multiple HPV types in the tissue may trigger cellular responses not yet described.

Given the variations in sensitivity and specificity among the methodologies that are available today, assumptions based only on one HPV detection method or technique may underestimate the true prevalence of HPV.^{32,33} On the other hand, the use of only one genotyping method may overestimate the value of some HPV types detected when multiple HPV types are present, that would otherwise not be detected by other techniques due to the very low viral load of that specific HPV type.

5 | CONCLUSIONS

The prevalence of HPV detected in the oral mucosa of the Fanconi anemia (FA) patients assessed in this study was higher than estimates from other studies with FA patients and from other studies in the general population. Additional studies with sequential samples collection are needed in order to acquire knowledge on the natural history of the HPV infection in those patients, comparing detection rates and the results among those with mono and multiple HPV types detected, with the objective of evaluating the implementation of preventive measures, such as vaccination, and of guiding early treatment, which may improve life quality and life expectancy of FA patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Academic Publishing Advisory Center (Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica, CAPA—www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná for assistance with English language editing.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

MEGP: Conceptualization, methodology, sample and data collection, result analysis, investigation, writing draft. MBN and LRRV: Supervision laboratory data, funding acquisition. AHD and E.F: sample and data collection. CB, CCTP and LLR: Review medical records and supervision. SMR: Conceptualization, methodology, formal analysis, resources, writing and editing the manuscript, project administration, and funding acquisition. All the authors drafted and approved the final version of the report.

ORCID

Magda Eline Guerrart Portugal  <http://orcid.org/0000-0002-6586-9087>

Sonia Mara Raboni  <https://orcid.org/0000-0001-7907-7585>

REFERENCES

1. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet*. 2001;2:446-458.
2. Fei P, Yin J, Wang W. New advances in the DNA damage response network of fanconi anemia and BRCA proteins: FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle*. 2005;4(1):80-86.
3. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Clin Obs Interv Ther Trials*. 2003;101(3):822-826.
4. Bagby G. Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi Anemia. *F1000Research*. 2018;7:105.
5. Kimble DC, Lach FP, Gregg SQ, et al. A comprehensive approach to identification of pathogenic FANCA variants in Fanconi anemia patients and their families. *Hum Mutat*. 2018;39:237-254.
6. Yoon BG, Kim HN, Han UJ, et al. Long-term follow-up of Fanconi anemia: clinical manifestation and treatment outcome. *Korean J Pediatr*. 2014;57(3):125-134.
7. Bonfim C, Ribeiro L, Nichele S, et al. Long-term survival, organ function, and malignancy after hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(7):1257-1263.
8. Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*. 2005;105(1):67-73.
9. Mathew CG. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene*. 2006;25(43):5875-5884.
10. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(1):106-112.
11. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-350.
12. Thomas LK, Bermejo JL, Vinokurova S, et al. Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract—a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2014;50(1):85-98.
13. Lowy DR, Gillison ML. A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus-associated malignancies. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(22):1648-1650.
14. van Zeeburg H, Snijders P, Wu T, et al. Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(22):1649-1653.
15. Alter BP, Giri N, Savage SA, Quint W, de Koning M, Schiffman M. Squamous cell carcinomas in patients with Fanconi anemia and dyskeratosis congenita: a search for human papillomavirus. *Int J Cancer*. 2013;133(6):1513-1515.
16. Winer RL, Huang CE, Cherne S, et al. Detection of human papillomavirus in the oral cavities of persons with Fanconi Anemia HHS public access. *Oral Dis*. 2015;21(3):349-354.
17. de Araujo MR, Rubira-Bullen I, Santos CF, et al. High prevalence of oral human papillomavirus infection in Fanconi's anemia patients. *Oral Dis*. 2011;17(6):572-576.
18. Dinguleski A, Kluk E, Rotta JT, Portugal MEG, Burci LM, Raboni SM. Detection of human papillomavirus (HPV) from buccal swabs. *Revista Gestão & Saúde*. 2017;16(2):9-15.
19. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase

- M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(14):1159-1164.
20. Jacobs MV, De Roda Husman AM, Van den Brule A, Snijders P, Meijer C, Walboomers J. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4):901-905.
 21. Evans MF, Adamson C, Simmons-Arnold L, Cooper K. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Clin Pathol.* 2005;5:1-14.
 22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 1992;24:104-108.
 23. Chang CT, Tsai CN, Tang CY, et al. Mixed sequence reader: A program for analyzing DNA sequences with heterozygous base calling. *Sci World J.* 2012;2012:1-10.
 24. Sauter SL, Wells SI, Zhang X, et al. Oral human papillomavirus is common in individuals with Fanconi anemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(5):864-872.
 25. Gillison ML, Broutian T, Pickard R, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307(7):693.
 26. De Roda Husman AM, Walboomers J, Van den Brule A, Meijer C, Snijders P. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995;76(4):1057-1062.
 27. Tucker RA, Johnson PR, Reeves WC, Icenogle JP. Using the polymerase chain reaction to genotype human papillomavirus DNAs in samples containing multiple HPVs may produce inaccurate results. *J Virol Methods.* 1993;43(3):321-333.
 28. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang C, Ho G. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1304-1310.
 29. Guerrero E, Daniel RW, Bosch FX, et al. Comparison of ViraPap, southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 1992;30(11):2951-2959.
 30. de Villiers EM, Gunst K. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol.* 2009;90(8):1999-2004.
 31. Ekström J, Forslund O, Dillner J. Three novel papillomaviruses (HPV109, HPV112 and HPV114) and their presence in cutaneous and mucosal samples. *Virology.* 2010;397(2):331-336.
 32. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2095-2100.
 33. Smits HL, Bollen LJ, Tjong A, et al. Intermethod variation in detection of human papillomavirus DNA in cervical smears. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2631-2636.

How to cite this article: Portugal MEG, Raboni SM, Nogueira MB, et al. High frequency of multiple HPV types detection in Fanconi anemia patients' oral swabs. *Transpl Infect Dis.* 2018;e13030. <https://doi.org/10.1111/tid.13030>